

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ESTUDOS DA ESTRUTURA COMPORTAMENTAL DE
CAMUNDONGOS NOS TESTES DE NADO FORÇADO E DA
SUSPENSÃO PELA CAUDA.**

ANA PAULA RAMOS COSTA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thereza Christina
Monteiro de Lima

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Cilene Lino de
Oliveira

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

C837e Costa, Ana Paula Ramos
Estudo da estrutura comportamental de camundongos nos
testes de nado forçado e da suspensão pela cauda
[dissertação] / Ana Paula Ramos Costa ; orientadora, Thereza
Christina Monteiro de Lima. - Florianópolis, SC, 2012.
85 p.: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Modelos animais em pesquisa. 3.
Depressão. 4. Análise fatorial. I. Lima, Thereza Christina
Monteiro de. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Agradecimentos

À Deus, por ter me dado a família que eu tenho, saúde e interesse para seguir minha jornada.

Aos meus pais, meus primeiros e eternos educadores, que não mediram esforços para tornar possível meu sonho. Por serem os melhores pais que alguém possa querer.

À minha avó Mariinha, por ter auxiliado nos custos dos meus estudos e por ter sido sempre a minha vizinha, e mesmo agora, lá de cima continua a me guiar nas minhas decisões e meu caminho.

À minha avó Guiomar, por ter me dado as melhores férias durante o mestrado.

Aos meus irmãos, por serem meus irmãos, meus amigos e meus segundos pais.

Ao meu sobrinho, por tornar minha vida mais colorida.

À minha tia Ana, por ser sempre uma entusiasta do meu trabalho, por não me deixar desistir quando tudo parecia difícil e por ser minha consultora do mundo acadêmico.

Às minhas amigas que me acompanham desde quando fazer faculdade de Biologia ainda era um sonho e fazer mestrado ainda não era uma possibilidade: Alice, Camila, Nina Rosa, Michelle e Elise.

Aos amigos que fiz durante o período deste trabalho: Cristina Stern, Filipe, Sandro, Karina e Vanessa.

Ao meus colegas de turma que caminharam junto comigo durante o mestrado: Kaká, Manu, Thiago, Lara, Mariane, Muryel, Frank, Taci, Gabriela e em especial ao Paulo, Ana Carol e Maíra que mais que colegas se tornaram meus grandes amigos.

Aos amigos da graduação e do coração: Ligia, Natália, Mari, Marcelo, Loli, Fer e Aninha.

Aos meus cães, que sempre alimentaram o meu amor pelo estudo da vida e por serem os melhores amigos do mundo.

Ao professor Silvio Sato, por ter feito eu me apaixonar pela biologia.

Aos meus professores da graduação, por terem me dado a certeza daquilo que eu escolhi para a vida.

Aos professores do departamento, que sempre foram muito solícitos quando precisei.

Ao professor Dr. Leandro José Bertoglio pelas conversas pelos corredores do departamento e em seu laboratório.

Aos meus ex-colegas do Laboratório de Genética do Comportamento e ao professor Dr. André Ramos, que contribuíram em grande parte da minha formação científica.

Aos professores que aceitaram compor a banca de avaliação deste trabalho: Prof^ª Dra. Stela Maris Rates, Prof^º Dr. André de Ávila Ramos e Prof^º Leandro José Bertoglio.

Aos servidores desta instituição que colaboram para o funcionamento dela.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Neurofarmacologia, local que escolhi e fui aceita para trilhar meu caminho dentro da pesquisa.

Aos meus colegas do laboratório, Renata, Nayana, Ludimila, Claudini, Gilliard, Evelyn, Andressa, Alexandre e Leonaldo, por toda ajuda, pelo convívio e pela comilança de sempre.

Aos colegas Alexandre e Marcelo, por serem ótimos conselheiros e amigos.

Ao colega Leonardo Guarnieri, pelas belíssimas gravuras feitas para compor este trabalho.

À Rebeca Marques dos Santos, por estar sempre disposta a ajudar e por ser uma fofa.

À Claudini Honório de Pieri, por toda ajuda prestada ao longo do meu trabalho, por ser minha pupila e por me deixar exercer o que eu gosto de fazer: ensinar.

À minha colaboradora mais que perfeita, Evelyn Santos, por me aturar diariamente do seu lado, por me ajudar sempre que eu preciso, por ser meu braço direito e minha grande amiga.

À minha co-orientadora Cilene Lino de Oliveira, por ter confiado a mim este lindo projeto e por estar sempre disponível.

À minha orientadora, Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima, pela confiança, pela orientação e por ser acima de tudo uma amiga doce e atenciosa.

*“Necessitamos sempre de ambicionar alguma coisa que, alcançada, não
nos torna sem ambição”*

(Carlos Drummond de Andrade)

Resumo

A depressão é considerada uma doença potencialmente ameaçadora à vida, com um índice de suicídio chegando a 15% entre os deprimidos. Os fármacos antidepressivos proporcionam uma completa remissão para apenas cerca de 50% dos indivíduos, além de causarem vários efeitos colaterais. Portanto, modelos animais de atividade antidepressiva mostram-se ferramentas valiosas para auxiliar a pesquisa sobre a neurobiologia da doença e para avaliar novos fármacos antidepressivos. O teste do Nado Forçado (TNF) e o teste da Suspensão pela Cauda (TSC) são os testes mais usados para este tipo de avaliação devido sua fácil utilização principalmente. Entretanto, estes testes ainda são pouco sensíveis e específicos. Assim, buscamos verificar, no presente trabalho, se uma avaliação mais ampla e detalhada do catálogo comportamental apresentado pelos animais poderia superar essas limitações. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estrutura temporal e fatorial do comportamento de camundongos Swiss submetidos ao TNF (n=30) e ao TSC (n=30), aplicando um catálogo composto por comportamentos ativos e passivos. Uma amostra completa contendo latência, duração e frequência de cada comportamento durante o período total do teste, foram agrupadas em blocos de 6 minutos totais, blocos dos 4 últimos minutos e bloco minuto-a- minuto. A análise temporal dos comportamentos mostrou que os animais apresentam mais comportamentos ativos nos 2 minutos iniciais de ambos os testes e, a partir deste momento, os comportamentos passivos é que são mais evidenciados. A análise fatorial dos comportamentos apresentados no teste do nado forçado revelou a existência de 3 componentes principais (83% da variância), enquanto que para o TSC revelou a existência de 4 fatores (93% da variância). A confiabilidade da análise fatorial foi testada pela distribuição aleatória de grupos de 10 animais para o tratamento com NaCl 0,9% (grupo controle), medicamentos antidepressivos (imipramina, desipramina e fluoxetina, 30mg/kg,i.p.) ou com estimulante motor (caféina , 30mg/kg, i.p) 30 minutos antes de serem submetidos ao TNF ou ao TSC. Tanto os antidepressivos, quanto a caféina, apresentaram os efeitos esperados, pois em ambos os testes: reduziram o tempo total de imobilidade. Entretanto, a caféina e os antidepressivos modulam de maneiras diferentes os comportamentos ativos apresentados pelos animais, o que permitiu a discriminação entre essas duas classes de fármacos. Além disso, as alterações metodológicas na aquisição e análise dos dados também permitiu a separação dos mecanismos de ação dos distintos antidepressivos no TNF e no TSC.

Palavras-chave: modelos animais, depressão, análise fatorial, estrutura comportamental.

Abstract

Depression is currently considered a life-threatening disease, with a suicide rate reaching 15% among depressed patients. Antidepressant drugs provide complete remission to only about 50% of patients and cause several side effects. Therefore, animal models of antidepressant activity appear to be valuable tools to further understanding the neurobiology of disease and to evaluate new antidepressant drugs. The forced swimming test (FST) and the tail suspension test (TST) have been the most widely used tests for this type of evaluation mainly because of their ease of use. However, these tests still lack sensitivity and specificity. We here studied if the evaluation of a wider than the current catalog of behaviors could overcome these limitations. Thus, the objective of this study was to evaluate temporal and factorial structure of the behavior of Swiss mice submitted to FST (n=30) or TST (n=30) applying a catalog comprising active and passive behaviors. A complete sampling was performed over the period of either test generating frequencies and durations, which were summarized in 1 block of 6 minutes, 1 block of the last 4 minutes or 6 blocks of 1 minute (min-by-min). The temporal analysis of behaviors in the FST and TST showed that active behaviors were more prevalent in the first 2 minutes of the tests when the passive postures started to increase. The factorial analysis of behaviors in the FST provided a model with 3 components (86% of the variance) whereas in the TST were obtained 4 components (93% of the variance). The reliability of factorial analysis was tested by the random assignment of groups of 10 mice for treatment with NaCl 0.9% (control group), antidepressant drugs (imipramine, desipramine and fluoxetine, 30mg/kg, IP) or with motor stimulant (caffeine, 30mg/kg, IP) prior FST or TST. Antidepressants and caffeine showed the expected effects on mice in FST and OFT, i.e., a reduced immobility time. However, caffeine and antidepressants affected different pools of active behaviors which allowed the discrimination between the two classes of drugs in FST or TST. Moreover, the methodological changes in the data acquisition and data analysis allowed the separation of antidepressant compounds with distinct mechanisms of action in FST or TST.

Keywords: animal models, depression, factorial analysis, structure of behavior.

Lista de Figuras

Figura 1. Efeito do tratamento com imipramina (30 mg/kg, via i.p.), desipramina (30 mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30 mg/kg, via i.p.) e cafeína (30 mg/kg, via i.p.) no parâmetro latência para imobilidade em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda42

Figura 2. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) nos parâmetros tempo total de imobilidade relaxada, tempo total de imobilidade flexionada, tempo total de movimentação difusa e tempo total de movimentação ritmada em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Em A, resultados da análise dos 6 min totais do teste e em B a análise dos últimos 4 min do mesmo.....44

Figura 3. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) nos parâmetros frequência total de imobilidade, frequência total de movimentação difusa e frequência total de movimentação ritmada em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Em A os resultados da análise dos 6 min totais do teste e em B a análise dos últimos 4 min do mesmo.....46

Figura 4. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo de imobilidade relaxada minuto a minuto (A) e na frequência de imobilidade relaxada (B) de camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Os resultados estão representados como média de 10 animais, minuto a minuto.....48

Figura 5. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo de movimentação difusa (A) e na frequência de movimentação difusa (B) minuto a minuto em camundongos machos

submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Os resultados estão representados como média de 10 animais, minuto a minuto.....50

Figura 6. . Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo de movimentação ritmada (A) e frequência de movimentação ritmada (B) minuto a minuto em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Os resultados estão representados como média de 10 animais, minuto a minuto.....52

Figura 7. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) na latência para imobilidade, nado e escalada de camundongos Swiss submetidos ao teste do nado forçado.....56

Figura 8. A) Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo total de imobilidade, nado e escalada de camundongos Swiss submetidos ao teste do nado forçado. B) Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo nos últimos 4 min de imobilidade, nado e escalada de camundongos Swiss submetidos ao teste do nado forçado.....57

Figura 9. A) Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) na frequência total de imobilidade, nado e escalada de camundongos Swiss submetidos ao teste do nado forçado. B) Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) na frequência nos últimos 4 min de imobilidade, nado e escalada de camundongos Swiss submetidos ao teste do nado forçado.....59

Figura 10. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo (A) e na frequência (B) de imobilidade minuto a minuto em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Os resultados estão representados como média de 10 animais, minuto a minuto.....61

Figura 11. . Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo (A) e frequência (B) de nado minuto a minuto em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda.....63

Figura 12. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo (A) e frequência (B) de escalada minuto a minuto em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda.....65

Lista de Quadros

Quadro 1. Parâmetros comportamentais obtidos após da submissão de 30 camundongos Swiss ao teste da suspensão cauda.....	39
Quadro 2. Parâmetros comportamentais obtidos minuto-a-minuto a partir da submissão de 30 camundongos Swiss ao teste da suspensão pela cauda.....	40
Quadro 3. Distribuição da estrutura fatorial obtida através do método da rotação ortogonal Varimax de comportamentos apresentados por camundongos swiss submetidos ao teste da suspensão pela cauda.....	41
Quadro 4. Parâmetros comportamentais obtidos após da submissão de 30 camundongos Swiss ao teste do nado forçado.....	53
Quadro 5. . Parâmetros comportamentais obtidos minuto-a-minuto após a submissão de 30 camundongos Swiss ao teste do nado forçado.....	54
Quadro 6. . . Distribuição da estrutura fatorial obtida através do método da rotação ortogonal Varimax de comportamentos apresentados por camundongos swiss submetidos ao teste do nado forçado.....	55
Quadro 7. Resumo dos resultados obtidos no teste da suspensão pela cauda.....	68
Quadro 8. Resumo dos resultados obtidos no teste do nado forçado.....	73

Lista de Abreviações

ACP – Análise de componentes principais

AD – fármacos antidepressivos

E.P.M – Erro padrão da média

FST – *Forced swimming test*

i.p. – intraperitoneal

ISRN – inibidores seletivos da receptação de noradrenalina

ISRS – inibidores seletivos da receptação de serotonina

MAO – enzima monoamina oxidase

min. – minutos

Mov. - movimentação

TNF – Teste do nado forçado

TSC – Teste de suspensão pela cauda

TST - *Tail suspension test*

QTLs – *Quantative trait loci*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	O USO DE ANIMAIS NA PESQUISA CIENTÍFICA.....	23
1.2	O USO DE ANIMAIS EM PSIQUIATRIA – O EXEMPLO DA DEPRESSÃO	25
2	JUSTIFICATIVA.....	32
3	OBJETIVOS	32
3.1	GERAL	32
3.2	ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	ANIMAIS	33
4.2	CONDIÇÕES GERAIS.....	33
4.3	FÁRMACOS.....	34
4.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	35
4.4.1	<i>Experimento 1: Mapa Etológico de animais submetidos ao Teste da Suspensão pela Cauda (TSC)</i>	<i>35</i>
4.4.2	<i>Experimento 2: Avaliação de animais tratados com Imipramina, Desipramina, Fluoxetina e Cafeína submetidos ao Teste da Suspensão pela Cauda (TSC).....</i>	<i>36</i>
4.4.3	<i>Experimento 3: Mapa Etológico de animais submetidos ao Teste do Nado Forçado (TNF)</i>	<i>36</i>
4.4.4	<i>Experimento 4: Avaliação de animais tratados com Imipramina, Desipramina, Fluoxetina e Cafeína submetidos ao teste do Nado Forçado.</i>	<i>37</i>
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4.6	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP).....	37
5	RESULTADOS.....	39
5.1	EXPERIMENTO 1: MAPA ETOLÓGICO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO TESTE DA SUSPENSÃO PELA CAUDA (TSC)	39
5.2	<i>Experimento 2: Tratamento com imipramina, desipramina, fluoxetina e cafeína em animais submetidos ao Teste da Suspensão pela Cauda (TSC).....</i>	<i>42</i>

	<i>5.3 Experimento 3: Mapa Etológico de animais submetidos ao Teste do Nado Forçado (TNF).....</i>	<i>53</i>
	<i>5.4 Experimento 4: Avaliação de animais tratados com Imipramina, Desipramina, Fluoxetina e Cafeína submetidos ao teste do Nado Forçado.....</i>	<i>55</i>
6	DISCUSSÃO	66
6.1	DISCUSSÃO GERAL	66
6.2	O COMPORTAMENTO DOS CAMUNDONGOS <i>SWISS</i> NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA (TSC).....	67
6.3.	O COMPORTAMENTO DOS CAMUNDONGOS <i>SWISS</i> NO TESTE DE NADO FORÇADO.	72
7	CONCLUSÃO	78
8	REFERÊNCIAS	79

1 Introdução

1.1 O uso de animais na pesquisa científica

Há milhares de anos, animais são utilizados para vestuário, alimentação, em geral, e também na ciência (FEIJÓ; BRAGA; PITREZ, 2010). Inseridas neste contexto, as investigações na área da saúde são realizadas há mais de dois mil anos, tendo início, provavelmente, com os estudos de Hipócrates (450 a.C.) que relacionava o aspecto de órgãos humanos doentes com o de animais, com finalidades claramente didáticas (RAYMUNDO; GOLDIM, 2002). Anos mais tarde, Aristóteles (384-322 a.C.) realizou uma série de estudos comparando órgãos de animais humanos e animais não humanos, constatando que existem semelhanças e diferenças de conformação e funcionamento dos mesmos (COBEA, 1996). Cerca de 500 anos depois, Galeno (131-201 d.C.) ficou conhecido como um dos precursores das ciências médicas experimentais, realizando vivisseções com objetivos experimentais, ou seja, de testar variáveis através de alterações provocadas nos animais (RAYMUNDO; GOLDIM, 2002).

A primeira pesquisa científica, feita sistematicamente com animais, que se tem notícia talvez seja a realizada por William Harvey, publicada em 1638 no livro *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*, no qual o autor apresenta os resultados obtidos em estudos experimentais sobre a fisiologia da circulação sanguínea (REICH, 1995). Contudo, foi Claude Bernard, por volta de 1865, quem lançou os princípios do uso de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana (FAGUNDES; TAHA, 2004). Mais especificamente, seu trabalho “Introdução ao Estudo da Medicina Experimental” procurou estabelecer as regras e os princípios para o estudo experimental da medicina, enfatizando a aplicabilidade da experimentação animal aos humanos ao promover situações físicas e químicas que resultavam em alterações nos animais semelhantes à de doenças em humanos (BERNARD, 1865 apud FAGUNDES; TAHA, 2004). Cientistas, como William Harvey e Claude Bernard, mostraram claramente que a experimentação animal controlada é um método importante de pesquisa nas ciências biológicas (IVY, 1948).

Então, ao longo dos séculos XVI, XVII e XVIII, as investigações utilizando animais tornaram-se mais frequentes, com repercussão direta no avanço da atenção à saúde dos seres humanos e de outros animais (FEIJÓ; BRAGA; PITREZ, 2010). Entretanto, o uso desta estratégia chamou a atenção de muitas pessoas e no século XIX começam a surgir as primeiras sociedades protetoras dos animais: a primeira foi criada na Inglaterra, em 1824, com o nome de “Society for the Preservation of Cruelty to Animals” que, em 1840,, foi assumida pela Rainha Vitória, recebendo a denominação

de “Royal Society” (FEIJÓ; BRAGA; PITREZ, 2010). Já em 1845, na França, foi criada a Sociedade para a Proteção dos Animais e em anos posteriores foram fundadas sociedades similares na Alemanha, Bélgica, Áustria, Holanda e Estados Unidos (FEIJÓ; BRAGA; PITREZ, 2010). A primeira lei a regulamentar o uso de animais em pesquisa foi proposta no Reino Unido, em 1876, através do “British Cruelty to Animal Act” (HMSO, 1990 apud RAYMUNDO; GOLDIM, 2002). Em 1909 surgiu a primeira publicação norte-americana sobre aspectos éticos da utilização de animais em experimentação, proposta pela Associação Médica Americana (AMA, 1909 apud FEIJÓ; BRAGA; PITREZ, 2010). Em 1959, o zoólogo William Russel e o microbiologista Rex Burch propuseram o uso dos 3 R’s (em inglês: replace, reduce, refine; em português: substituir, reduzir, refinar) nas práticas de experimentação animal. Os 3R’s da experimentação animal continuam sendo citados até os dias atuais como um objetivo a ser atingido para a adequação da pesquisa em modelos animais (FEIJÓ; BRAGA; PITREZ, 2010).

No Brasil, após inúmeras discussões, leis e normativas específicas, a legislação que regulamenta o uso de animais em ensino e pesquisa foi publicada em 2008. A lei nº 11.794, de 08.10.2008 estabelece a criação do CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal o qual tem a responsabilidade de, entre outros objetivos, “formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica”. Além disso, a lei determina a constituição prévia de Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs, que têm a competência de fazer cumprir a lei 11.794 e, entre outras atribuições, examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na instituição à qual estejam vinculadas, para determinar sua compatibilidade com a legislação.

A experimentação em seres humanos exige uma série de requisitos extras para resguardar a integridade física e psicoemocional dos investigados e é regulamentada por uma legislação distinta daquelas aplicadas na experimentação animal (FAGUNDES; TAHA, 2004). Em humanos, as limitações de coleta de material para investigação podem ficar restritas a um ou dois aspectos de manifestação da doença, sendo necessários vários grupos de estudo para abordar a multiplicidade de apresentação dos fenômenos patológicos (FLETCHER et al, 1996 apud FAGUNDES; TAHA, 2004). Portanto, segundo Fletcher e colaboradores (1996), o uso de modelos animais de doenças humanas pode superar estas limitações e proporcionar a investigação de uma relação causal de modo mais rápido, menos trabalhoso e menos oneroso. A este respeito, vale à pena mencionar que durante o primeiro quarto do século XIX, pesquisas utilizando animais foram responsáveis por mais da metade das principais

descobertas deste período no que diz respeito ao tratamento de doenças humanas e animais (NICOLL; RUSSELL, 1991).

1.2 O uso de animais em psiquiatria – o exemplo da depressão

Atualmente, a depressão é considerada uma doença humana potencialmente ameaçadora à vida, com um índice de suicídio entre deprimidos chegando a 15%, e afetando cerca de 20% da população mundial (BERTON; NESTLER, 2006). Estima-se que no Brasil 54 milhões de pessoas terão em algum momento de suas vidas algum episódio de depressão, sendo que 7,5 milhões destes episódios serão agudos e graves, com altíssimo risco de suicídio (NARDI, 2000). Neste contexto, o transtorno depressivo maior surge como um grande problema de saúde pública devido a sua prevalência e seu impacto na função psicossocial e na qualidade de vida de pacientes e familiares envolvidos (PAPAKOSTAS et al., 2004; SIMON et al., 1995).

Existem várias classes de antidepressivos usados para o tratamento da depressão. Estas drogas podem agir inibindo a enzima monoamina oxidase (MAO), ou atuando sobre os sistemas de recaptação das monoaminas em conjunto, como é o caso dos antidepressivos tricíclicos (NEMEROFF; OWENS, 2002). Os antidepressivos podem ainda ser inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) ou de noradrenalina (ISRN), aumentando assim a concentração destes neurotransmissores na fenda sináptica (NEMEROFF; OWENS, 2002). Os antidepressivos tricíclicos e os inibidores da enzima MAO foram introduzidos no tratamento da depressão na década de 1950, enquanto os antidepressivos ISRS e ISRN só foram introduzidos na década de 1980 (MAUBACH et al., 1999). Uma limitação da terapia antidepressiva é que os fármacos antidepressivos proporcionam uma completa remissão para apenas cerca de 50% dos indivíduos diagnosticados como deprimidos, além de causarem efeitos colaterais de intensidade variável, sendo alguns a razão do abandono do tratamento (BRUNELLO et al., 2002).

Embora os primeiros fármacos modernos de ação psicofarmacológica tenham sido descobertos acidentalmente quando utilizados para o tratamento de distúrbios psiquiátricos ou de outras doenças - como a imipramina no tratamento da esquizofrenia e a iproniazida, na tuberculose - atualmente os modelos animais tem contribuído decisivamente no desenvolvimento dos tratamentos da depressão e esquizofrenia (WEISS, 1998). Assim, os modelos animais formam o eixo principal da pesquisa pré-clínica sobre a neurobiologia de transtornos psiquiátricos, e são usados tanto como ferramentas de triagem na busca de novos agentes terapêuticos como para simulações de estudos sobre os mecanismos subjacentes a estes

transtornos (RODGERS, 1997). Este tipo de abordagem, apesar de suas limitações, permite o estudo da contribuição de um dado fator em determinado transtorno mental, controlando-se as outras variáveis, bem como estudar a interação entre as múltiplas variáveis – fato este que ganha maior importância devido à característica multifatorial destes transtornos (MCKINNEY, 2000 apud ANDREATINI, 2002).

Uma das maiores limitações da utilização de modelos animais nos estudos de transtornos psiquiátricos é o fato de que tais modelos limitam a análise do pesquisador à observação de alterações comportamentais ou fisiológicas à custa da característica eminentemente subjetiva e introspectiva dos transtornos mentais (ANDREATINI, 2002; GUIMARÃES, 1993; RODGERS, 1997). Apesar disto, a importância dos modelos animais na compreensão da neurobiologia dos transtornos mentais pode ser constatada ao se comparar o grande número de teorias propostas para a depressão, por exemplo - para a qual existem vários modelos - com um número proporcionalmente menor de teorias propostas para a neurobiologia da mania - para a qual quase não existem modelos bem validados, apesar de esses quadros coexistirem nos pacientes com transtorno bipolar (ANDREATINI, 2002). Portanto, modelos animais de depressão podem ser considerados importantes na identificação de potenciais alvos antidepressivos, possibilitando também um melhor entendimento das vias e mecanismos responsáveis pela ação destes fármacos. Os ensaios pré-clínicos, deste modo, contribuem substancialmente para uma melhor compreensão dos transtornos depressivos e para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o seu tratamento (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; KRISHNAN; NESTLER, 2008; NESTLER et al., 2002).

É difícil imaginar um modelo animal que mimetize perfeitamente os sintomas da depressão em humanos (DEUSSING, 2006). A simulação e aferição do humor deprimido, da baixa autoestima ou dos pensamentos de morte são extremamente complexas, uma vez que estes sintomas dependem do relato do próprio indivíduo (CRYAN; MOMBÉREAU, 2004; DEUSSING, 2006; HOLMES et al., 2002; PETIT-DEMOULIER; CHENU; BOURIN, 2005). No entanto, a depressão, assim como outros transtornos mentais, é também constituída por uma série de endofenótipos (sendo o endofenótipo uma característica estrutural interna de organismo que não pode ser observada a olho nu e que é geneticamente determinado podendo ser útil como biomarcadores moleculares de doenças psiquiátricas, por exemplo) que podem ser reproduzidos de forma independente nos animais, incluindo alterações fisiológicas (alterações no sono), endocrinológicas (diminuição dos níveis de serotonina) e neuroanatômicas (redução do volume do hipocampo), bem como suas características comportamentais (HASLER, 2004).

De acordo com algumas teorias evolucionistas é perfeitamente plausível que se estude transtornos psiquiátricos em animais de menor complexidade na escala evolutiva baseados no fato de que muitas características podem ter sido preservadas, podendo ser úteis na modelagem do estado patológico humano nos animais (CRYAN; MOMBÉREAU, 2004; JONES; BLACKSHAW, 2000; NESSE, 2000). No entanto, tais hipóteses são fortemente debatidas e difíceis para se tratar empiricamente (DUBROVSKY, 2002; MCLOUGHLIN, 2002). Mais importante é não assumir sempre que os comportamentos apresentados pelos animais durante os testes são comportamentos similares aos dos humanos, tomando-se muita cautela com análises exageradamente antropomórficas (CRAWLEY, 2000).

Os requisitos mínimos para que um modelo animal seja validado foram propostos por McKinney e Bunney em 1969: o modelo deve (a) ter sintomatologia razoavelmente semelhante à doença humana (validade analógica, face validity), (b) causar alterações comportamentais que podem ser monitoradas objetivamente, (c) produzir mudanças comportamentais que são revertidas pelos fármacos padrão utilizados com sucesso na clínica médica (validade preditiva) e (d) deve ser reprodutível em qualquer laboratório.

Assim, originalmente, os modelos animais de depressão foram concebidos como testes de triagem para avaliar a eficácia de fármacos antidepressivos, porém estes testes tendem a negligenciar o aspecto da validade analógica, preservando, entretanto, uma forte validade preditiva em relação à identificação eficiente de substâncias antidepressivas (DEUSSING, 2006).

A maioria dos modelos animais para o estudo de transtornos psiquiátricos é baseada em comportamentos encontrados naturalmente nos animais quando em seu ambiente selvagem, sendo que estes comportamentos podem aparecer por estímulos condicionados ou incondicionados (RODGERS, 1997). Entretanto, os estímulos condicionados normalmente dependem de privação de água ou comida, o uso de choques elétricos e tempo considerável para o treinamento dos animais testados (RODGERS, 1997). Em contraste, apesar de sujeito a maiores variações, modelos envolvendo o comportamento espontâneo do animal possuem uma maior validade etológica, sendo menos suscetível a interferência de aprendizado e memória, o que acontece com comportamentos condicionados (RODGERS, 1997).

Nos últimos 50 anos diversos modelos animais de depressão têm sido propostos, testados e avaliados (CRYAN; MOMBÉREAU, 2004; DALVI; LUCKI 1999; HOLMES 2003; LUCKI, 1997; WILLNER, 1984). A maioria deles é baseada nas alterações comportamentais produzidas pelo estresse, drogas, excisão ou lesões de estruturas cerebrais (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Um dos modelos de avaliação de atividade

antidepressiva mais utilizado na fase pré-clínica é o modelo de desespero comportamental, como por exemplo, o teste do nado forçado (TNF), desenvolvido por Porsolt e colaboradores no ano de 1977, e o teste da suspensão pela cauda (TSC) desenvolvido por Stéru e colaboradores em 1985. O TNF e o TSC têm sido muito usados para avaliar a atividade antidepressiva na fase pré-clínica, devido a sua fácil utilização, grande reprodutibilidade entre os laboratórios e a sua grande habilidade de detectar um grande espectro de agentes antidepressivos (BORSINI; MELI, 1988; CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; NESTLER et al., 2002).

De acordo com Porsolt e colaboradores (1977, 1978), quando submetemos um animal (rato ou camundongo) a um estresse inescapável, como sua colocação num cilindro contendo água, o animal desempenhará movimentos de fuga dessa situação supostamente desagradável e em poucos minutos adotará a postura imóvel (ausência total de movimentos ou com movimentos muito leves suficientes para deixar a cabeça do animal emersa). O teste do nado forçado mudou a maneira de se fazer a triagem de drogas antidepressivas, devido a sua reprodutibilidade relativa ao longo de diferentes laboratórios e a sua capacidade de detectar uma gama de antidepressivos clinicamente eficazes (RUPNIAK, 2003; WEISS; KILTS, 1998). O tratamento agudo ou crônico com antidepressivos é capaz de reduzir o tempo de imobilidade apresentado pelos animais submetidos a este teste (DAVID et al, 2003; LUCKI et al., 2001; PETIT-DEMOULIERE et al, 2005).

O TSC foi desenvolvido por Stéru (1985) baseado nas mesmas premissas de Porsolt (1977): um animal submetido a uma situação estressante e inescapável apresenta dois tipos de comportamentos alternados, a agitação, característica da tentativa de escape da situação de estresse, e a imobilidade. Este padrão de comportamento também pode ser chamado de "searching-behavior", caracterizado pela alternância de intensa atividade motora e gasto de energia com a imobilidade (Stéru, 1985). Alguns cientistas utilizam o estresse inescapável da suspensão de um camundongo pela cauda para obter informações valiosas sobre a habilidade dos animais de lidar em situações estressantes (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Como esperado, de maneira semelhante ao teste do nado forçado, fármacos antidepressivos comumente utilizados na clínica são capazes de reduzir o tempo de imobilidade de animais submetidos ao TSC (STÉRU et al., 1985).

Muitas hipóteses têm sido desenvolvidas para tentar explicar o significado da postura de imobilidade que os animais apresentam nestes testes (CRYAN; MOMBÉREAU, 2004). A imobilidade no contexto do TNF foi originalmente cunhada como uma resposta de "desespero comportamental" (behavioral despair) por Porsolt (1978), em grande parte baseada no pressuposto de que os animais têm "a esperança de escapar" e a

“perdem” com poucos minutos de teste ao perceberem que não há saída possível da situação (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Outro grupo de pesquisadores interpreta como uma estratégia evolutiva preservada (THIERRY et al., 1984) que pode ser relacionada ao estado psicológico de encurralamento descrito na depressão clínica (DIXON, 1998; GILBERT; ALLAN, 1998; LUCKI, 2001). Além disso, a imobilidade pode ser devido à incapacidade ou relutância em manter o esforço em vez de uma hipoatividade generalizada ou mesmo uma estratégia de preservação de energia (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005).

Embora os testes do nado forçado e da suspensão pela cauda tenham sido construídos de maneira semelhante, provavelmente eles diferem no que diz respeito aos substratos biológicos envolvidos nas respostas, mesmo apresentando respostas convergentes diante de potenciais fármacos antidepressivos (BAI et al., 2001; PORSOLT, 2000; RENARD et al., 2003). Acredita-se, entretanto, que o TSC é menos estressante que o TNF (THIERRY ET AL., 1986) e é bem conhecido que a maioria dos antidepressivos reduz a duração da imobilidade no TSC em doses menores que as necessárias para o mesmo efeito no TNF (LIU E GERSHENFELD, 2001), e que os ISRS são mais ativos no TSC que no TNF (GUARDIOLA-LEMAÎTRE, B. ; LENÈGRE, A.; PORSOLT, R.D, 1992). Estas diferenças na resposta farmacológica no TNF e no TSC sugerem que possa haver diferenças genéticas nas imobilidades de cada teste, com sobreposições e distinções. A este respeito, Yoshikawa et al. (2002) analisaram 560 camundongos da F2 do cruzamento das linhagens C57BL/6 (B6) e C3H/He (C3) para identificar determinantes genéticos da duração de imobilidade em ambos os testes, TNF e TSC. Seus resultados revelaram substratos genéticos distintos, embora com algumas sobreposições, nos dois fenótipos que podem ser responsáveis pelas diferenças nos perfis farmacológicos dos antidepressivos no TNF e TSC (PORSOLT E LENEGRE 1992; LIU E GERSHENFELD 2001; LUCKI ET AL. 2001).

Uma vantagem óbvia destes dois testes é a sua capacidade para detectar um amplo espectro de antidepressivos (independentemente do seu mecanismo de ação) além de serem baratos e metodologicamente simples (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). No entanto, para que se possam discriminar as diferentes classes de antidepressivos que respondem aos testes, experimentos adicionais com diferentes linhagens de animais ou metodologias são necessários (BOURIN et al., 2005). Estas estratégias são utilizadas para atingir maior seletividade e previsibilidade no teste do nado forçado em camundongos (BOURIN et al., 2005; LUCKI et al., 2001), mas todos eles exigem vários grupos experimentais (e, consequentemente, um grande número de animais) e dependem maior tempo.

Aliado a este fator, alguns problemas ocorrem com ambos os testes: o tratamento agudo com doses elevadas de fármacos antidepressivos

altera o tempo de imobilidade em um curto período de tempo, enquanto que nos seres humanos o mesmo tratamento antidepressivo leva semanas para produzir tal efeito (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Além disso, o modelo pode apresentar resultados falsos positivos como, por exemplo, com drogas estimulantes do sistema motor como as anfetaminas (PRESTON WEST, 1990).

O método tradicionalmente utilizado para analisar o teste no nado forçado, por exemplo, envolve apenas a medida do tempo de imobilidade, porém este método apresenta falhas por não descrever nenhum comportamento ativo produzido pelos animais durante o teste (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995). Sendo assim, uma nova técnica de amostragem foi desenvolvida para contabilizar também os comportamentos ativos, adicionando os mesmos ao catálogo comportamental desempenhado pelos animais, tais como o nado (movimento horizontal ao redor do cilindro) e a escalada (movimento vertical sobre as paredes do cilindro) (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; LINO-DE-OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2005; PAGE, 1999). Esta técnica foi desenvolvida por Detke e colaboradores (1995) e permitiu a diferenciação de fármacos ISRN de ISRS; onde ISRN diminuem a imobilidade e aumentam a escalada e ISRS diminuem a imobilidade e aumentam a natação. Entretanto este novo método não descarta resultados falso-positivos e assim existe a necessidade de se realizar experimentos adicionais com modelos que avaliem a atividade locomotora. O modelo amplamente utilizado para esta finalidade é o teste do campo aberto, que avalia, entre outros parâmetros, a atividade locomotora dos animais (HALL, 1934; KELLY, 1993).

Uma avaliação mais detalhada aliada a modificações no catálogo de repertório comportamental, métodos de pontuação e protocolos têm melhorado a validade preditiva do TNF em ratos (BORSINI et al., 1989; CRYAN, et al., 2005; DAL ZOTTO; MARTI; ARMARIO, 2000; DETKE et al., 1997). Como exemplo podemos citar a metodologia utilizada por Kitada e colaboradores (1981) onde os ratos foram submetidos a uma sessão de teste mais longa (30 min) que a convencional (6 min), que possibilitou discriminar os fármacos antidepressivos daqueles que não possuem tal efeito. Lino-de-Oliveira e colaboradores (2005) analisaram a estrutura comportamental de ratos durante o TNF, fornecendo uma informação importante: o parâmetro frequência de escalada possui correlação com parâmetros relacionados a atividade motora no teste do campo aberto, o que evitaria a necessidade de outros testes para avaliar a atividade motora dos animais. Em concordância com tal achado, Vieira e colaboradores (2008) observaram que ratos tratados com cafeína desempenharam maior frequência de escalada no TNF e ao mesmo tempo apresentaram aumento de atividade locomotora detectado pelo teste do campo aberto. Em conjunto, os trabalhos de Lino-de-Oliveira e colaboradores (2005) e Vieira e

colaboradores (2008) nos permite a conclusão de que não é necessário o uso de um novo grupo experimental para análise da atividade locomotora como uma maneira de descartar resultados falso-positivos no TNF, possibilitando uma economia de tempo, dinheiro e, principalmente, de animais, em concordância com o esforço de reduzir e refinar o método de avaliação usado, dentro dos conceitos éticos dos 3Rs.

A fim de aprimorar estes novos métodos, técnicas estatísticas também foram usadas (LINO-DE-OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2005). Como exemplos de estratégias utilizadas para melhorar a validade preditiva do TNF em ratos, podemos citar a observação e mensuração dos comportamentos de nado, escalada e imobilidade, medidas tomadas minuto a minuto, medidas somente dos últimos 4 min, contabilização do número de episódios de cada comportamento durante o teste (BORSINI et al., 1989; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005; DAL ZOTTO et al., 2000; DETKE et al., 1997; KITADA et al., 1981; LINO-DE-OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2005; VIEIRA et al., 2008) entre outros. A transposição destes novos métodos para o teste em camundongos pode, portanto, indicar um caminho para o desenvolvimento de um teste mais robusto, usando menor número de camundongos além de facilitar o estudo com alvos biológicos relevantes, uma vez que o número de animais geneticamente manipulados (transgênicos ou nocautes, por exemplo, SOLOMON et al., 2011) é maior nesta espécie do que em ratos, o que também pode contribuir para um melhor entendimento da psicopatologia e do seu tratamento.

Além disso, faz-se necessária a transposição deste tipo de avaliação mais detalhada com modificações no protocolo e forma de observação e mensuração semelhantes ao teste do nado forçado em ratos para camundongos, também para o teste da suspensão pela cauda que vem se tornando cada vez mais popular entre os pesquisadores.

A este respeito, recentemente, Berrocoso e colaboradores (2012) propuseram uma nova forma de avaliar o teste da suspensão pela cauda, também distinguindo os comportamentos ativos dos animais durante o teste. Neste estudo, os comportamentos apresentados pelos animais foram classificados em: “curling” – movimento em que o animal desempenha a torção de seu corpo inteiro, “swinging” – o animal movimenta suas patas verticalmente e/ou movimentando seu corpo de um lado para outro e a tradicional imobilidade que é a ausência de movimentos ativos (BERROCOSO et al., 2012).

2 Justificativa

Apesar de amplamente utilizados em pesquisas pré-clínicas e apresentarem validade preditiva, o TSC e TNF em camundongos apresentam falhas na sua seletividade (apresentam resultados falso-positivos) e no seu poder de resolução (capacidade de discriminar fármacos com diferentes mecanismos de ação). Como já mencionado, Lino-de-Oliveira e colaboradores (2005) observaram a estrutura comportamental de ratos no teste do nado forçado, o que colaborou para o maior entendimento do teste nesta espécie animal. Entretanto, nenhum estudo foi feito até o momento para investigar a estrutura comportamental de camundongos neste teste. Além disso, até há pouco tempo nenhum estudo havia sido feito com o teste da suspensão pela cauda. Somente em 2012 o grupo da Universidade de Cádiz (BERROCOSO et al., 2012) apresentou um tipo de avaliação mais detalhada do teste de suspensão pela cauda que permite a diferenciação de fármacos antidepressivos dos opióides, sem, no entanto, fazer qualquer comparação entre os dois testes. Sendo assim, uma investigação mais detalhada dos comportamentos apresentados por camundongos nos testes do nado forçado e da suspensão pela cauda mostra-se importante no sentido de auxiliar na compreensão e interpretação dos mesmos como testes preditivos da atividade antidepressiva, além do objetivo de se reduzir os grupos experimentais, o número de animais e o tempo despendido com baterias de investigação de fármacos com possíveis efeitos do tipo antidepressivo.

3 Objetivos

3.1 Geral

O objetivo do presente estudo foi encontrar variáveis comportamentais no TNF e TSC que permitissem aumentar a seletividade e poder de resolução destes testes na triagem de substâncias com potencial antidepressivo em camundongos.

3.2 Específicos

- transpor novos métodos de avaliação já utilizados para ratos, para camundongos Swiss machos submetidos ao TNF,
- criar um catálogo comportamental detalhado dos camundongos Swiss machos no TSC,
- aplicar os métodos de avaliação utilizados para o TNF na avaliação do TSC.

- comparar o desempenho de camundongos Swiss nos testes do TNF e TSC após o tratamento com antidepressivos clássicos com diferentes mecanismos de ação.

4 Material e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados 130 camundongos Swiss machos com idade entre 3 e 4 meses (40 a 50 g). Todos os animais foram alojados em grupos de no máximo 20 congêneres por caixa (dimensões de 33 cm x 40 cm x 18 cm) e mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2°C); ciclo claro/escuro 12/12 h, com luzes se acendendo às 07:00 h; acesso à água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram executados sempre no período claro, entre às 13:00 h e às 18:00 h e de acordo com os padrões internacionais de bem-estar animal recomendados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), sendo e os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética Sobre o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (23080.024594/2010-87/CEUA/UFSC).

4.2 Condições Gerais

Todos os tratamentos com fármacos foram realizados por via intraperitoneal (i.p.), 30 min antes dos animais serem avaliados nos testes comportamentais. A dose utilizada, determinada de acordo com a literatura (desipramina – STÉRU, 1985; imipramina – ECKELI, 2000 apud CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005; fluoxetina – Rodrigues et al, 2002 apud CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005); cafeína – STÉRU, 1987.), para todos os tratamentos foi de 30 mg/kg com volume de administração de 0,1ml/10g de peso e todos os testes possuíam um grupo controle tratado com o veículo de solubilização (solução salina, NaCl 0,9%).

Os animais foram testados individualmente 30 min após o tratamento via i.p., tempo necessário para ação destes fármacos.

Para os diferentes testes comportamentais, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: controle (solução salina), imipramina 30mg/kg, desipramina 30 mg/kg, fluoxetina 30 mg/kg e cafeína 30 mg/kg. A distribuição dos animais tratados foi de maneira uniforme, intercalando os animais dos diferentes grupos de tratamento.

Para cada teste foi utilizado um número de 10 animais por grupo de tratamento, conforme o cálculo executado de acordo com as normas estatísticas adequadas, como apresentado a seguir:

$$n = \frac{s^2 (z_{\alpha} + z_{\beta})^2}{(\sigma)^2}$$

onde,

s = desvio padrão

z_{α} = erro do tipo I - 0,05

z_{β} = erro do tipo II - 0,10

δ = diferença entre as médias

$$n = \frac{40^2 (1.96 + 1.28)^2}{(40)^2} \longrightarrow n \cong 10$$

Todos os animais permaneceram uma hora em ambientação antes do início do tratamento. Tanto a sala de ambientação quanto a sala de experimentação foram iluminadas com luz branca (160 lux).

4.3 Fármacos

Os fármacos utilizados neste trabalho foram:

- Cloridrato de Fluoxetina sc-201125 lote #L1010 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (RODRIGUES ET AL.,2002);
- Cloridrato de Desipramina sc-200158 lote #G0510 L1010 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), um antidepressivo tricíclico que inibe preferencialmente a receptação de noradrenalina (BERNARDI ET AL., 1989);
- Cloridrato de Imipramina [113-52-0] EC nº 204-030-7 lote 79H0847 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), um antidepressivo tricíclico, inibidor não seletivo da recaptação de monoaminas (O'NEILL ET AL.,1996);
- Cafeína EC nº 200-362-1 lote 066K0085 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), um estimulante, agonista dos receptores adenosinérgicos (STERU ET AL.,1987).

4.4 Testes Comportamentais

4.4.1 *Experimento 1: Mapa Etológico de animais submetidos ao Teste da Suspensão pela Cauda (TSC)*

O teste da suspensão pela cauda foi proposto por Stéru (1985) e adaptado em nosso laboratório. O procedimento consistiu em suspender cada animal pela cauda, com o auxílio de uma fita adesiva, na bancada de experimentos a uma altura de 1,5 m do chão, de maneira tal que o animal permanecesse com a porção ventral do corpo voltada para a câmera de registros. Cada animal permaneceu nesta posição durante 6 min sendo filmado por uma a câmera (webcam conectada ao sistema GEOVISION 800®) posicionada a 40 cm na frente do animal.

Após a observação não-sistemática dos vídeos obteve-se a definição dos comportamentos que comporiam o catálogo comportamental que consistiu das seguintes categorias: 1- imobilidade: ausência de movimentos bruscos (o animal pode movimentar levemente a cabeça ou as patas dianteiras, sem que mexesse o corpo) ou ausência total de movimento, 2- imobilidade flexionada: o animal permanece imóvel segurando suas patas ou sua cauda, 3- movimentação difusa: movimentos não repetitivos, em todas as direções possíveis (esquerda, direita, para cima, para trás), 4- movimentação ritmada: movimentação repetitiva, algumas vezes em pêndulo, idêntica para esquerda e para a direita.

Após a definição do catálogo, cada vídeo foi analisado manualmente e sistematicamente com o auxílio um software (X-plo-Rat®) para determinação da latência, frequência e duração de cada uma das categorias comportamentais. A latência, expressa em segundos, se refere ao tempo gasto entre o início do teste e o primeiro episódio de uma determinada categoria; a frequência de cada categoria reflete o número de vezes que a mesma se repetiu durante um dado período de tempo; o tempo total (duração), expresso em segundos, reflete a soma de tempo gasto em todos os episódios de uma determinada categoria em um determinado período de tempo. Cada categoria foi delimitada por um intervalo de 3 s, i.e., as medidas eram iniciadas assim que o animal permanecia por, pelo menos, 3 s exibindo o mesmo comportamento. As variáveis frequência e duração foram totalizadas das seguintes maneiras: 1- em um bloco de 6 min (duração total do teste), 2- em um bloco de 4 min (últimos minutos do teste que é o período de menor atividade dos animais), 3- em 6 blocos de 1 min (análise minuto- a- minuto).

4.4.2 *Experimento 2: Avaliação de animais tratados com Imipramina, Desipramina, Fluoxetina e Cafeína submetidos ao Teste da Suspensão pela Cauda (TSC)*

Nesta etapa cada grupo de animais foi tratado com diferentes tipos de antidepressivos: fluoxetina – inibidor seletivo da receptação da serotonina, imipramina – antidepressivo tricíclico, inibidor não seletivo de recaptção de serotonina e noradrenalina, desipramina – antidepressivo tricíclico com maior afinidade para inibir o transportador da noradrenalina e cafeína – estimulante antagonista de receptores de adenosina do tipo A1 e A2a (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). As variáveis foram registradas e analisadas como definido no experimento 1.

4.4.3 *Experimento 3: Mapa Etológico de animais submetidos ao Teste do Nado Forçado (TNF)*

O teste do nado forçado foi primeiramente proposto para ratos (PORSOLT, 1977) e então adaptado para camundongos (PORSOLT, 1978). O teste consiste em colocar o animal em um tanque cilíndrico (béquer de plástico de 1L, 13 cm de diâmetro) contendo água limpa a 25°C e a uma profundidade de 11,5 cm. Cada animal permaneceu por 6 min no cilindro com água, e durante o teste cada animal apresentou diversos comportamentos que puderam ser mensurados manualmente. Após o término do teste, cada animal foi seco com uma toalha e mantido por pelo menos 15 min sob uma lâmpada de 40W para que não ficassem com frio. A cada animal a água do cilindro era substituída por água limpa. Todas as sessões do teste foram gravadas por uma câmera posicionada a 20 cm da borda do cilindro para que os registros fossem analisados posteriormente.

O catálogo comportamental utilizado foi aquele definido por Lino-de-Oliveira et al. (2005) para ratos e consistiu das seguintes categorias: 1- imobilidade: ausência de movimentos bruscos, onde o animal pode apresentar somente movimentos mínimos necessários para manter a cabeça acima da água, ou permanecer boiando sobre a água, 2- nado: movimentos horizontais do animal pelo tanque, normalmente fazendo uma trajetória circular, movimentando as 4 patas vigorosamente, 3- escalada: movimento vertical do animal, geralmente apoiando-se nas paredes do tanque, fazendo movimentos como se fosse escalar as mesmas. Após a definição do catálogo, cada vídeo foi analisado sistematicamente com um software (Xplo-Rat®) para determinação da latência, frequência e duração de cada uma das categorias comportamentais. Da mesma maneira que no teste de suspensão pela cauda, a latência, expressa em segundos, se refere ao tempo gasto entre o início do teste e o primeiro episódio de uma determinada categoria; a frequência de cada categoria reflete o número de vezes que a

mesma se repetiu durante um dado período de tempo; o tempo total (duração), expresso em segundos, reflete a soma de tempo gasto em todos os episódios de uma determinada categoria em um determinado período de tempo. Cada categoria era delimitada por um intervalo de 3 s, i.e., as medidas eram iniciadas assim que o animal permanecia por, pelo menos, 3 s exibindo o mesmo comportamento. As variáveis frequência e duração foram totalizadas das seguintes maneiras: 1- em um bloco de 6 min (duração total do teste), 2- em um bloco de 4 min (últimos minutos do teste que é o período de menor atividade dos animais), 3- em 6 blocos de 1 min (análise minuto-a-minuto).

4.4.4 Experimento 4: Avaliação de animais tratados com Imipramina, Desipramina, Fluoxetina e Cafeína submetidos ao teste do Nado Forçado.

Nesta etapa cada grupo de animais foi tratado com diferentes tipos de antidepressivos: fluoxetina – inibidor seletivo da receptação da serotonina, imipramina – antidepressivo tricíclico, inibidor não seletivo de receptação de serotonina e noradrenalia, desipramina – antidepressivo tricíclico com maior afinidade para inibir o transportador da noradrenalina e cafeína – estimulante antagonista de receptores adenosinérgicos A1 e A2a (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005).

4.5 Análise Estatística

Os dados foram expressos como a média + erro padrão da média (e.p.m.). As comparações estatísticas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de 2 vias de medidas repetidas para as análises minuto a minuto. Os grupos foram comparados entre si, usando-se o teste post-hoc de Bonferroni. Já para as análises totais, o teste utilizado foi ANOVA de 1 via e teste post hoc de Bonferroni. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $p < 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se software Prism 5.0®.

4.6 Análise de Componentes Principais (ACP)

A ACP foi realizada como publicado por Espejo et al. (1997) e Lino-de-Oliveira et al. (2005, 2011). Uma matriz incluindo variáveis (comportamentos nas colunas) e observações (frequência ou tempo nas linhas, $n=30$) foi submetida à análise de Componentes Principais seguida de rotação ortogonal Varimax. O número de componentes a serem extraídos

pela análise foi determinado utilizando o critério de Kaiser (Eigenvalues ou autovalores acima de 1). Valores de carregamento (loading values) iguais a + 1 indicam uma perfeita correlação da variável com o componente. Aqui arbitramos que os valores entre + 0.40 e + 0.60 apresentam moderada correlação e valores abaixo de + 0.40 nenhuma correlação da variável com o componente.

5 Resultados

5.1 Experimento 1: Mapa Etológico de animais submetidos ao Teste da Suspensão pela Cauda (TSC)

O quadro 1 mostra os resultados obtidos da análise de 30 animais (blocos de 6 e dos 4 últimos minutos) sem qualquer tratamento para a diferenciação dos comportamentos apresentados pelos mesmos durante o TSC.

Quadro 1. Parâmetros comportamentais obtidos após da submissão de 30 camundongos *Swiss* ao teste da suspensão cauda.

Parâmetro	Valor (Média+ E.P.M)
Latência Imob. Relaxada	87,8 \pm 11,12
Tempo Total Imob. Relaxada	141 \pm 12,54
Frequência Imob. Relaxada	8,53 \pm 0,59
Latência Imob. Flexionada	306 \pm 20,21
Tempo Total Imob. Flexionada	24,86 \pm 10,80
Frequência Imob. Flexionada	1,83 \pm 0,77
Latência Mov. Difusa	0,4 \pm 0,4
Tempo Total de Mov. Difusa	165,83 \pm 8,56
Frequência Mov. Difusa	11,33 \pm 0,62
Latência Mov. Ritmada	255,13 \pm 23,09
Tempo Total Mov. Ritmada	19,16 \pm 5,57
Frequência Mov. Ritmada	1,46 \pm 0,32
Tempo Total Imob. Relaxada *	118,56 \pm 11,02
Frequência Imob. Relaxada *	6,36 \pm 0,48
Tempo Total Imob. Flexionada *	23,13 \pm 9,93
Frequência Imob. Flexionada *	1,56 \pm 0,66
Tempo Total de Mov. Difusa *	77,2 \pm 6,91
Frequência Mov. Difusa *	7,9 \pm 0,53
Tempo Total Mov. Ritmada *	17,13 \pm 5,52
Frequência Mov. Ritmada *	1,13 \pm 0,26

Os dados estão expressos como média+erro padrão da média.* Resultados para os últimos 4 minutos de avaliação.

Já o quadro 2 expõe os dados obtidos através da análise minuto a minuto dos mesmos parâmetros nos mesmos 30 animais submetidos ao TSC sem qualquer tratamento.

Quadro 2. Parâmetros comportamentais obtidos minuto-a-minuto a partir da submissão de 30 camundongos *Swiss* ao teste da suspensão pela cauda.

Parâmetro	Minuto 1	Minuto 2	Minuto 3	Minuto 4	Minuto 5	Minuto 6
Tempo Imobilidade Relaxada	1,6±0,69	21,43±2,45	29,46±3,05	30,36±3,5	28,86±3,6	29,85±3,44
Frequência Imobilidade Relaxada	0,3±0,1	1,86±0,21	1,8±0,19	1,46±0,19	1,6±0,2	1,5±0,14
Tempo Imobilidade Flexionada	0,13±0,13	1,6±0,9	3,5±1,75	7,03±3,05	6,4±2,94	6,16±2,64
Frequência Imobilidade Flexionada	0,03±0,03	0,23±0,13	0,26±0,13	0,36±0,16	0,36±0,16	0,56±0,24
Tempo Mov. Difusa	54,96±0,82	33,66±2,14	23,26±2,44	19,63±2,53	16,93±1,79	17,36±2,11
Frequência Mov. Difusa	1,3±0,1	2,1±0,18	2,16±0,19	1,83±0,17	2±0,23	1,93±0,22
Tempo Mov. Ritmada	0,5±0,3	1,53±0,7	2,43±1,29	2,1±0,9	7,2±2,9	5,4±2,4
Frequência Mov. Ritmada	0,1±0,05	0,23±0,1	0,16±0,06	0,26±0,1	0,33±0,09	0,36±0,13

Os dados estão expressos como média±erro padrão da média.

Quadro 3. Distribuição da estrutura fatorial obtida através do método da rotação ortogonal Varimax de comportamentos apresentados por camundongos *swiss* submetidos ao teste da suspensão pela cauda.

Componentes	I	II	III	IV
Parâmetro				
Tempo Imobilidade	0,85	-	-	-
Frequência Imobilidade	0,80	-	-	0,41
Tempo Imob. Flexionada	-0,94	-	-	-
Frequência Imob. Flexionada	-0,91	-	-	-
Tempo Mov. Difusa	-	-	-0,99	-
Frequência Mov. Difusa	-	-	-	0,97
Tempo Mov. Ritmada	-	-0,92	-	-
Frequência Mov. Ritmada	-	-0,87	-	-
%Variância	39	21	16	17
%Total Variância	93			

Estão representados apenas os valores superiores a $\pm 0,40$ para o bloco de 6 min.

A análise de componentes principais avaliou as medidas obtidas através da observação de 30 animais submetidos ao teste da suspensão pela cauda sem qualquer tipo de tratamento. Os resultados obtidos através desta análise passaram pelo método de rotação ortogonal para facilitar a interpretação dos dados do bloco de 6 min do teste. Este método gerou 4 fatores principais (quadro 3). As variáveis tempo de imobilidade relaxada, frequência de imobilidade relaxada e tempo e frequência de imobilidade flexionada são altamente correlacionadas com o primeiro fator. Os parâmetros de imobilidade relaxada são diretamente proporcionais, enquanto os parâmetros de imobilidade flexionada são inversamente proporcionais ao primeiro componente. Já o segundo componente é negativamente correlacionado com os parâmetros tempo e frequência de movimentação ritmada. O tempo de movimentação difusa foi correlacionado somente com o terceiro componente. Por fim, o quarto componente é composto pelos parâmetros frequência de imobilidade relaxada e frequência de movimentação difusa. Juntos, os 4 fatores representam 93% da variância de todos os parâmetros observados e registrados neste teste durante este trabalho.

5.2 Experimento 2: Tratamento com imipramina, desipramina, fluoxetina e cafeína em animais submetidos ao Teste da Suspensão pela Cauda (TSC)

A figura 1 mostra os resultados da Latência para Imobilidade apresentada pelos animais submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Como podemos observar apenas o grupo de animais tratados com cafeína apresenta um maior tempo de latência para imobilidade quando comparado com o grupo controle ($t(19) = 3,906$; $p = 0,0009$).

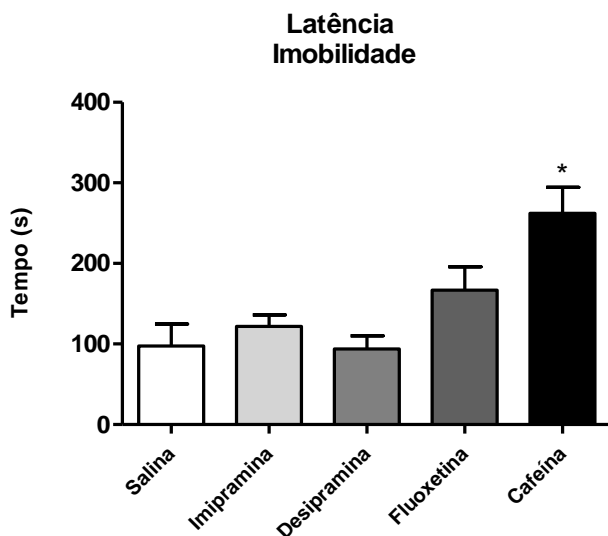


Figura 1. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no parâmetro latência para imobilidade em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. de 10 animais. Os dados foram analisados por teste t de Student. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Já a figura 2 representa o tempo total de imobilidade relaxada, imobilidade flexionada, movimentação difusa e movimentação ritmada de todos os grupos da análise, sendo que no painel A a análise foi feita utilizando-se os 6 minutos totais do teste e no painel B apenas os últimos 4 minutos.

Como podemos observar no painel A, no parâmetro tempo total de imobilidade relaxada a ANOVA de uma via revelou haver diferença estatística entre os grupos ($F(4,46) = 6,620$; $p = 0,0003$), segundo o teste *post*

hoc de Bonferroni os grupos dos animais tratados com fluoxetina e cafeína apresentaram um menor tempo total de imobilidade relaxada quando comparados com o grupo controle. Já para o parâmetro tempo total de imobilidade flexionada não foi detectada nenhuma diferença estatística na comparação entre todos os grupos. Para o parâmetro tempo total de movimentação difusa, a ANOVA de 1 via revelou haver diferença entre os grupos analisados ($F(4,46) = 17,58$; $p < 0,0001$), de acordo com o teste *post hoc* de Bonferroni os animais tratados com imipramina, desipramina e cafeína apresentaram maior tempo total de movimentação difusa quando comparados aos animais do grupo controle. Já quando a comparação é feita em relação ao grupo cafeína, a análise revelou que os grupos imipramina, desipramina e fluoxetina apresentam menor tempo de movimentação difusa. Para o parâmetro tempo total de movimentação ritmada a análise estatística revelou que existe diferença significativa entre os grupos tratados ($F(4,46) = 4,485$; $p = 0,0038$). De acordo com o teste de Bonferroni, os animais tratados com fluoxetina bem como aqueles que receberam cafeína como tratamento apresentaram menor tempo de movimentação ritmada quando comparados aos animais do grupo desipramina.

No painel B podemos observar que a análise feita utilizando-se os últimos 4 minutos de avaliação do teste. A ANOVA revelou haver diferença significativa entre os grupos ($F(4,45) = 5,359$; $p = 0,0013$) no parâmetro tempo de imobilidade relaxada. O teste de Bonferroni revelou que somente os animais tratados com cafeína apresentaram menor tempo de imobilidade relaxada quando comparados aos animais do grupo controle. Para o parâmetro tempo de imobilidade flexionada a análise estatística não revelou haver diferença significativa na comparação entre os grupos. No parâmetro tempo de movimentação difusa, a análise revelou que existe diferença significativa na comparação entre os grupos analisados ($F(4,46) = 14,88$; $p < 0,0001$). De acordo com o teste de Bonferroni os animais dos grupos imipramina, fluoxetina e cafeína apresentaram maior tempo de movimentação difusa quando comparados aos animais do grupo controle. Já em relação ao grupo cafeína, a análise revelou que os animais tratados com imipramina, desipramina e cafeína apresentam menor tempo de movimentação difusa. Para o parâmetro tempo total de movimentação ritmada a análise estatística revelou haver diferença entre os grupos analisados ($F(4,46) = 3,675$; $p = 0,0113$). O teste *post hoc* de Bonferroni revelou que os animais tratados com fluoxetina, bem como aqueles que receberam cafeína como tratamento, apresentaram menor tempo de movimentação ritmada quando comparados aos animais do grupo desipramina.

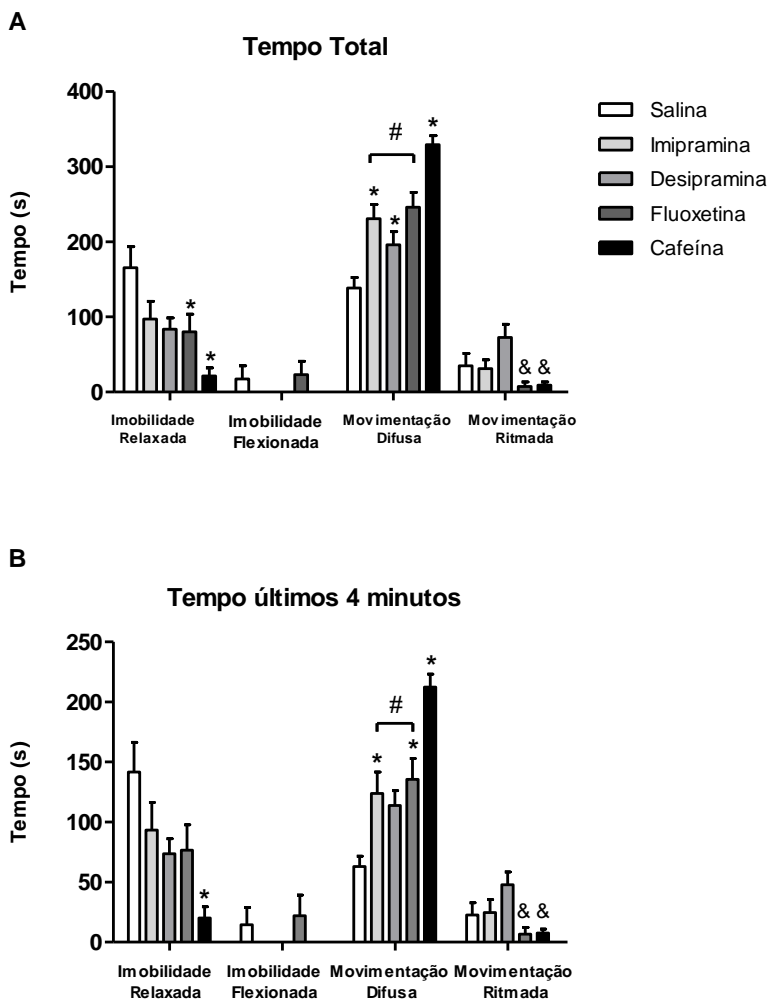


Figura 2. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) nos parâmetros tempo total de imobilidade relaxada, tempo total de imobilidade flexionada, tempo total de movimentação difusa e tempo total de movimentação ritmada em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Em A estão os resultados da análise dos 6 min totais do teste e em B a análise dos últimos 4 min do mesmo. Os resultados estão representados como média + e.p.m. de 10 animais. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, e teste *post hoc* de

Bonferroni. * para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle e # para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo cafeína.

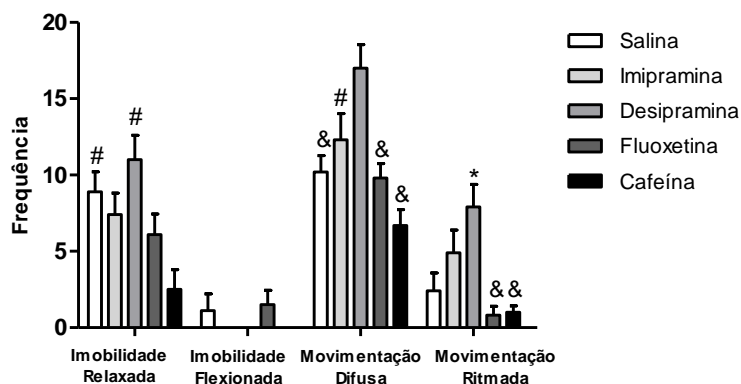
A figura 3 apresenta os resultados das frequências de imobilidade relaxada, imobilidade flexionada, movimentação difusa e movimentação ritmada; no painel A a análise foi feita utilizando-se os 6 minutos totais do teste e no painel B apenas os últimos 4 minutos foram considerados para análise. No parâmetro frequência de imobilidade relaxada a ANOVA de 1 via revelou haver diferença significativa entre os grupos de tratamento ($F(4,46) = 5,403$; $p = 0,0012$) e segundo o teste de Bonferroni os animais tratados com cafeína apresentaram menor tempo de imobilidade relaxada do que os animais do grupo controle bem como em relação aos animais do grupo desipramina.

Já para o parâmetro frequência de imobilidade flexionada a ANOVA de 1 via revelou não haver diferença significativa entre os grupos de tratamento. No parâmetro frequência total de movimentação difusa a ANOVA de 1 via revelou haver diferença significativa entre os grupos analisados ($F(4,46) = 8,859$; $p < 0,0001$). Segundo o teste do Bonferroni os animais tratados com desipramina apresentam maior número de frequência deste comportamento quando comparados aos animais tratados com cafeína, àqueles do grupo controle e aos que receberam fluoxetina como tratamento. Além disso, o teste de Bonferroni revelou que os animais tratados com imipramina apresentam menor frequência de movimentação difusa quando comparados os animais do grupo cafeína.

Por fim, a ANOVA de 1 via revelou haver diferença entre os grupos nos resultados de frequência de movimentação ritmada ($F(4,46) = 4,485$; $p = 0,0038$). De acordo com o teste de Bonferroni, o tratamento com desipramina foi capaz de aumentar a frequência de movimentação ritmada quando comparado aos animais dos grupos fluoxetina e cafeína.

A

Frequência Total



B

Frequência últimos 4 minutos

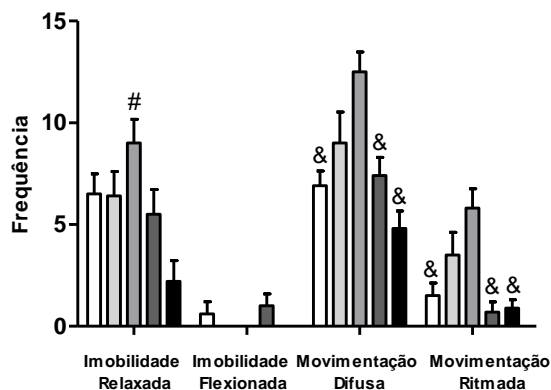


Figura 3. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) nos parâmetros frequência total de imobilidade, frequência total de movimentação difusa e frequência total de movimentação ritmada em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Em A estão os resultados da análise dos 6 min totais do teste e em B a análise dos últimos 4 min do mesmo. Os resultados estão representados como média + e.p.m. de 10 animais. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via e teste *post hoc* de Bonferroni.* para $p < 0,05$

quando comparado ao grupo controle. # para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo cafeína. & para $p < 0,05$ em relação ao grupo desipramina.

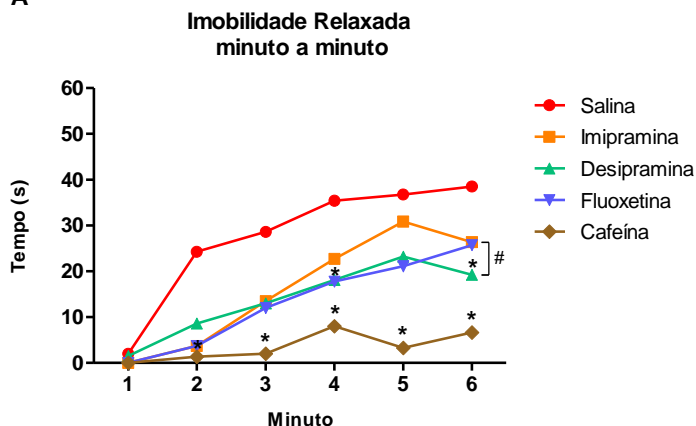
A figura 4A representa o tempo de imobilidade relaxada e 4B a frequência de imobilidade relaxada, analisados minuto a minuto. Como podemos observar no painel A, a ANOVA de 2 vias de medidas repetidas revelou haver interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(20, 225) = 2,65$; $p = 0,0003$). A análise também revelou ser significativo o fator tratamento ($F(4,225) = 5,94$; $p = 0,0006$) e o fator tempo ($F(5, 225) = 41,92$; $p < 0,0001$). Segundo o teste *post hoc* de Bonferroni, somente os animais tratados com cafeína apresentam menor tempo de imobilidade ao longo dos 6 min de teste, quando comparados com os animais do grupo controle.

Além disso, os animais do grupo cafeína também apresentaram menor tempo de imobilidade flexionada quando comparados aos animais do grupo fluoxetina, imipramina e desipramina. Já os animais do grupo tratado com fluoxetina apresentam menor tempo de imobilidade somente no quarto minuto. O tratamento com desipramina foi capaz de reduzir significativamente o tempo de imobilidade no último minuto do teste. Além disso, pode-se observar que, nos animais do grupo controle, o tempo de imobilidade aumenta à medida que o teste evolui.

Já no painel B podemos observar a frequência de imobilidade minuto a minuto e a ANOVA de 2 vias de medidas repetidas revelou quase haver interação entre os fatores ($F(20,225) = 1,58$; $p = 0,0590$). A análise também revelou ser significativo o fator tratamento ($F(4, 225) = 5,21$; $p = 0,0016$). O teste *post hoc* de Bonferroni revelou que o tratamento com cafeína foi capaz de reduzir o número de episódios de imobilidade nos minutos 2, 3 e 5 quando comparado com os animais do grupo controle. Este teste também revelou que o tratamento com fluoxetina foi capaz de reduzir este parâmetro somente no segundo minuto quando comparado ao grupo controle.

De maneira contrária, os animais que receberam desipramina como tratamento apresentaram um maior número de episódios de imobilidade no quarto minuto quando comparados aos animais do grupo controle.

A



B

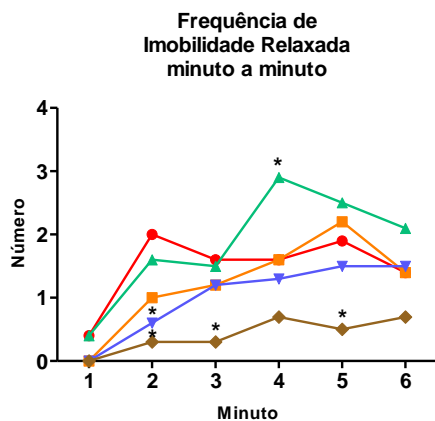


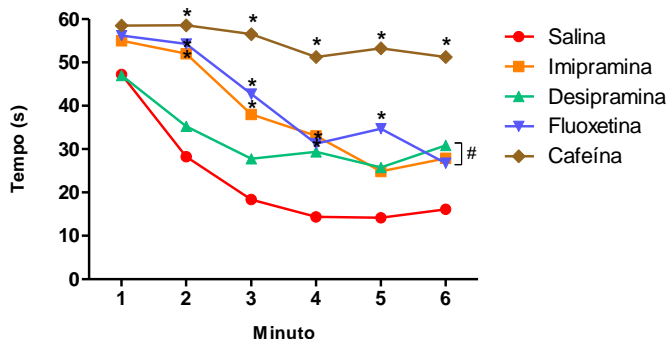
Figura 4. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo de imobilidade relaxada minuto a minuto (A) e na frequência de imobilidade relaxada (B) de camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Os resultados estão representados como média de 10 animais, minuto a minuto. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas com teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo cafeína.

A análise minuto a minuto do tempo e frequência de movimentação difusa está representada pela figura 5 em A e B, respectivamente. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas feita para o tempo de movimentação difusa revelou haver interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(20, 225) = 2,23$; $p = 0,0026$), além disso, revelou ser significativo o fator tratamento ($F(4,225) = 17,59$; $p < 0,0001$) e o fator tempo ($F(5,225) = 32,54$; $p < 0,0001$). No painel A podemos ver que o tratamento com cafeína foi o único capaz de aumentar o tempo de movimentação difusa durante todo o período do teste, revelado pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Além disso, os animais do grupo cafeína também apresentaram maior tempo de movimentação difusa quando comparados aos animais do grupo fluoxetina, imipramina e desipramina. Já os animais que receberam fluoxetina apresentam um maior tempo de movimentação difusa nos minutos 2, 3, 4 e 5 quando comparados aos animais do grupo controle. De maneira semelhante, os animais tratados com imipramina apresentam um maior tempo de movimentação difusa nos minutos 2,3 e 4. Os animais do grupo controle apresentam uma maior movimentação nos minutos iniciais do teste e esta movimentação cai ao longo do tempo total do teste.

Já no painel B podemos observar a frequência de movimentação difusa minuto a minuto, a ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou não haver interação entre os fatores tempo e tratamento, apesar de haver diferença significativa para o fator tratamento ($F(4,225) = 8,65$; $p < 0,0001$) e para o fator tempo ($F(5,225) = 6,14$; $p < 0,0001$). De maneira geral, os animais tratados com desipramina apresentaram maior número de episódios de movimentação difusa nos últimos 3 min do teste quando comparados aos animais que receberam solução salina. Já os outros tratamentos não foram capazes de alterar significativamente este parâmetro.

A

Tempo Movimentação Difusa minuto a minuto



B

Frequência Movimentação Difusa

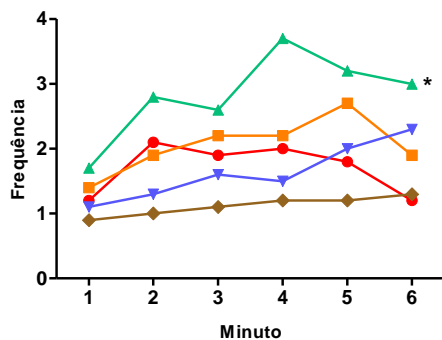
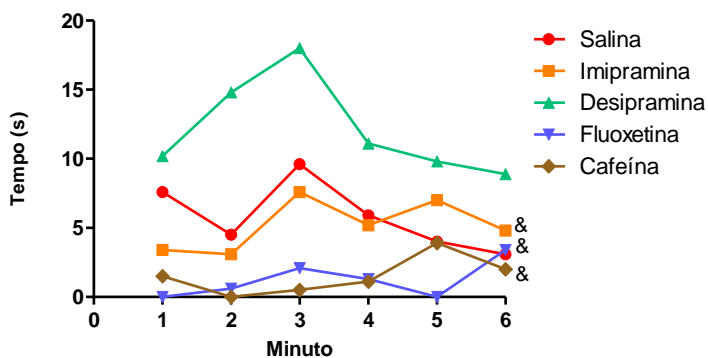


Figura 5. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo de movimentação difusa (A) e na frequência de movimentação difusa (B) minuto a minuto em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Os resultados estão representados como média de 10 animais, minuto a minuto. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas com teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # quando comparado ao grupo cafeína.

A seguir, a figura 6 apresenta os resultados do tempo (A) e frequência (B) de movimentação ritmada minuto a minuto. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou não haver interação entre os fatores ($F(20, 225) = 0,92$; $p = 0,56$), além disso, a análise também revelou ser significativo o fator tratamento ($F(4,225) = 4,48$; $p = 0,0039$). O teste *post hoc* de Bonferroni revelou que os animais tratados com imipramina, cafeína e fluoxetina apresentaram menor tempo de movimentação ritmada quando comparados aos animais do grupo desipramina. Para a frequência de movimentação ritmada a ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou não haver interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(20, 225) = 0,94$; $p = 0,54$) porém revelou haver diferença significativa no fator tratamento ($F(4,225) = 7,09$; $p = 0,0002$). O teste *post hoc* de Bonferroni revelou que tanto os animais tratados com cafeína quanto os animais tratados com fluoxetina apresentaram menor frequência de movimentação ritmada quando comparados aos animais do grupo desipramina.

A

Tempo de Movimentação Ritmada



B

Frequência Movimentação Ritmada

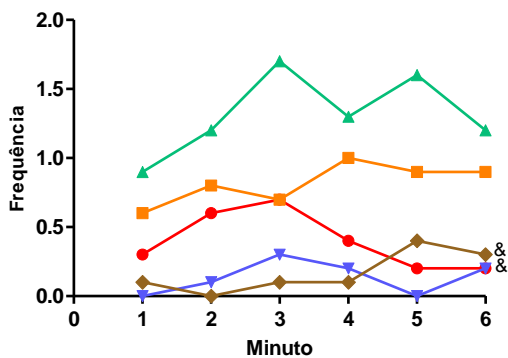


Figura 6. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo de movimentação ritmada (A) e frequência de movimentação ritmada (B) minuto a minuto em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Os resultados estão representados como média de 10 animais, minuto a minuto. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. & $p < 0,05$ em relação ao grupo desipramina.

5.3 Experimento 3: Mapa Etológico de animais submetidos ao Teste do Nado Forçado (TNF)

O quadro 4 mostra os resultados obtidos da análise de 30 animais (blocos de 6 e dos 4 últimos minutos) sem tratamento para a diferenciação dos comportamentos apresentados pelos animais durante o TNF.

Quadro 4. Parâmetros comportamentais obtidos após da submissão de 30 camundongos *Swiss* ao teste do nado forçado.

Parâmetro	Valor (s)(média +-E.P.M)
Latência Imobilidade	79,65±7,72
Latência Nado	21,92±3,72
Latência Escalada	17,8±10,17
Tempo Total Imobilidade	142,87±8,84
Frequência Imobilidade	9,4±0,53
Tempo Total Nado	147,57±10,13
Frequência Nado	11,8±0,64
Tempo Total Escalada	69,35±6,72
Frequência Escalada	5,2±0,59
Tempo Total Imobilidade *	122,62±7,49
Frequência Imobilidade *	7,1±0,34
Tempo Total Nado *	95,55±7,71
Frequência Nado *	7,8±0,42
Tempo Total Escalada *	21,12±3,4
Frequência Escalada *	2,5±0,52

Os dados estão expressos como média±erro padrão da média.

* Resultados para os últimos 4 minutos de avaliação.

Já o quadro 5 expõe os dados obtidos através da análise minuto a minuto dos mesmos parâmetros nos mesmos 30 animais submetidos ao TNF sem qualquer tratamento.

Quadro 5. Parâmetros comportamentais obtidos minuto-a-minuto após a submissão de 30 camundongos *Swiss* ao teste do nado forçado.

Parâmetro	Minuto 1	Minuto 2	Minuto 3	Minuto 4	Minuto 5	Minuto 6
Tempo Imobilidade	4,8 \pm 1,23	15,42 \pm 1,95	29,42 \pm 2,73	29,5 \pm 2,43	29 \pm 2,48	34,72 \pm 2,38
Frequência Imobilidade	0,65 \pm 0,14	1,65 \pm 0,21	1,67 \pm 0,15	1,67 \pm 0,13	2,05 \pm 0,15	1,7 \pm 0,17
Tempo Nado	22,25 \pm 2,35	29,8 \pm 2,88	23,22 \pm 2,72	23,9 \pm 2,53	26,47 \pm 2,44	21,92 \pm 2,05
Frequência Nado	2,24 \pm 0,19	1,67 \pm 0,17	1,9 \pm 0,17	2,05 \pm 0,15	2,1 \pm 0,17	1,82 \pm 0,15
Tempo Escalada	32,95 \pm 2,59	15,27 \pm 2,82	6,65 \pm 1,46	6,57 \pm 1,71	4,55 \pm 1,21	3,35 \pm 1,16
Frequência Escalada	2 \pm 0,17	0,72 \pm 0,13	0,67 \pm 0,12	0,67 \pm 0,14	0,65 \pm 0,28	0,5 \pm 0,16

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média.

A análise de componentes principais avaliou as medidas obtidas através da observação de 30 animais submetidos ao teste do nado forçado sem qualquer tipo de tratamento. Os resultados obtidos através da análise de componentes principais passaram pelo método de rotação ortogonal para melhor facilitar a interpretação dos dados do bloco de 6 min do teste que estão expostos no quadro 6. Os três componentes explicam 86% da variância dos dados. Como podemos observar, a latência para imobilidade, duração de nado foram diretamente correlacionados ao primeiro componente enquanto a duração de imobilidade foi inversamente correlacionada. Já o segundo, componente é diretamente correlacionado a frequência de imobilidade e frequência de nado e negativamente correlacionado a duração da escalada. Já o terceiro componente é positivamente correlacionado a duração da escalada e negativamente correlacionado a frequência de escalada.

Quadro 6. Distribuição da estrutura fatorial obtida através do método da rotação ortogonal Varimax de comportamentos apresentados por camundongos *swiss* submetidos ao teste do nado forçado.

Componente	I	II	III
Parâmetro			
Latência Imobilidade	0.8	-	-
Frequência Imobilidade	-	0.85	-
Duração Imobilidade	-0,93	-	-
Frequência Nado	-	0,92	-
Duração Nado	0.86	-	-
Frequência Escalada	-	-	-0,9
Duração Escalada	-	-0,54	0,74
%Variância	34	30	22
%Total Variância	86		

Em negrito estão os valores superiores a $\pm 0,40$.

5.4 Experimento 4: Avaliação de animais tratados com Imipramina, Desipramina, Fluoxetina e Cafeína submetidos ao teste do Nado Forçado.

A figura 7 nos mostra o efeito do tratamento com imipramina, desipramina, fluoxetina e cafeína na latência para a imobilidade, nado e escalada de animais submetidos ao teste do nado forçado. A ANOVA de 1 via revelou haver diferença significativa entre os grupos analisados. Como podemos observar, de acordo com o teste *post hoc* de Bonferroni, somente o tratamento com imipramina e o tratamento com desipramina foram capazes de aumentar o tempo de latência para a imobilidade quando comparados aos animais que receberam salina como tratamento.

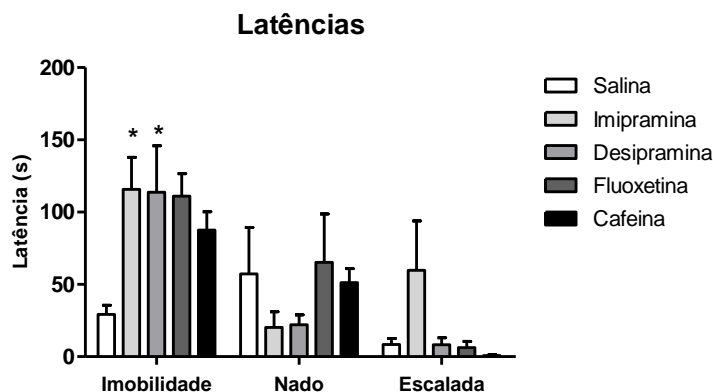


Figura 7. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) na latência para imobilidade, nado e escalada de camundongos *Swiss* submetidos ao teste do nado forçado. Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. de 10 animais. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via e teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Já na figura 8A a ANOVA de 1 via revelou haver diferença significativa entre os grupos analisados ($F(4,45) = 13,37$; $p < 0,0001$). O teste *post hoc* de Bonferroni revelou que todos os fármacos utilizados neste trabalho foram capazes de reduzir o tempo total de imobilidade quando comparados aos animais do grupo controle. Além disso, os animais tratados com cafeína apresentam menor tempo de imobilidade que os animais tratados com imipramina. Já quanto ao parâmetro tempo total de nado, a ANOVA de 1 via revelou haver diferença significativa entre os tratamentos ($F(4,45) = 3,742$; $p = 0,0103$). Segundo o teste de Bonferroni, os tratamentos com imipramina e desipramina apresentam maior tempo total de nado quando comparados aos animais do grupo controle. Já no parâmetro tempo total de escalada, a ANOVA de 1 via revelou que os grupos analisados possuem diferenças estatísticas ($F(4,45) = 22,41$; $p < 0,0001$). De acordo com o teste de Bonferroni os animais tratados com cafeína apresentam maior tempo de escalada quando comparados aos animais tratados com imipramina, desipramina, fluoxetina e salina.

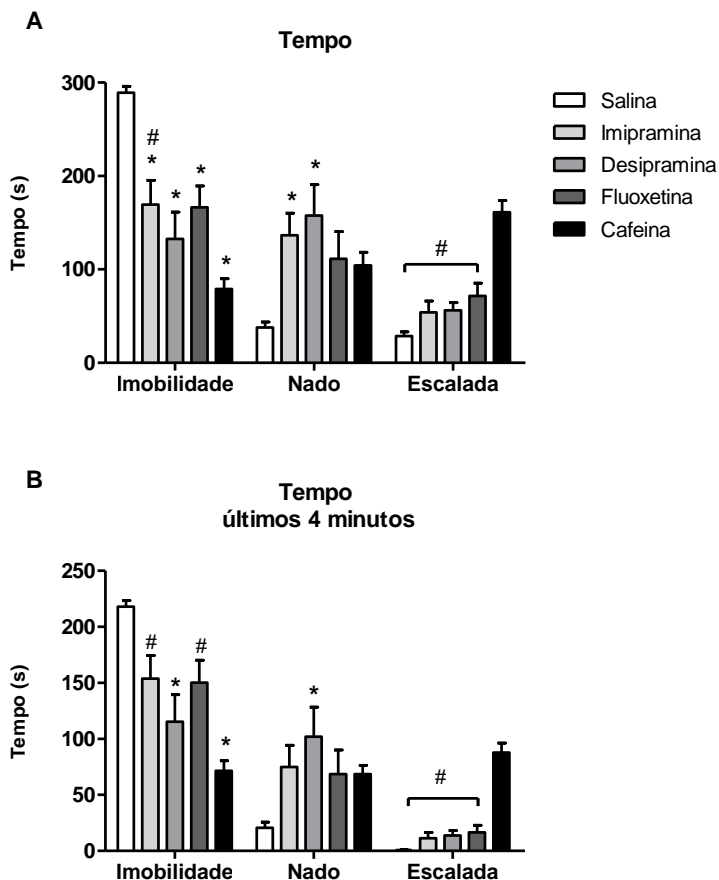


Figura 8. A) Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo total de imobilidade, nado e escalada de camundongos *Swiss* submetidos ao teste do nado forçado. B) Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo nos últimos 4 min de imobilidade, nado e escalada de camundongos *Swiss* submetidos ao teste do nado forçado. Os resultados estão representados como média + e.p.m. de 10 animais. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo cafeína.

A seguir, a figura 9 nos mostra os resultados das frequências de imobilidade, nado e escalada, no painel A estão os resultados do tempo total

de 6 min do teste e no B os últimos 4 min do teste. No painel A (6 min totais) a análise estatística não evidenciou nenhuma diferença entre os grupos analisados no parâmetro frequência de imobilidade. Entretanto, para o parâmetro frequência de nado a ANOVA de 1 via revelou haver diferença significativa entre os grupos tratados ($F(4,45)= 7,726$; $p<0,0001$). O teste *post hoc* de Bonferroni indicou que os animais tratados com imipramina, bem como os animais do grupo cafeína, apresentaram maior frequência deste comportamento ao longo dos 6 min do teste quando comparados aos animais do grupo controle. Além disso, indicou que os animais que receberam fluoxetina apresentam menor frequência de nado quando comparados aos animais do grupo imipramina.

Já o parâmetro frequência de escalada também foi alterado pelos tratamentos, resultado este indicado pela ANOVA de 1 via ($F(4,45)= 22,41$; $p<0,0001$). De acordo com o teste de Bonferroni, os animais dos grupos desipramina, fluoxetina e cafeína apresentaram maior frequência de escalada quando comparados aos animais do grupo controle. Além disso, o teste indicou que o tratamento com cafeína aumenta significativamente a frequência de episódios de escalada quando comparados aos tratamentos com imipramina, desipramina e fluoxetina. Ainda, o teste de Bonferroni indicou que os animais do grupo desipramina apresentam maior número de episódios de escalada durante os 6 min do TNF quando comparados aos animais do grupo imipramina.

No painel B (4 últimos min), a figura 8 mostra que os diferentes tratamentos não alteraram significativamente o parâmetro frequência de imobilidade. Entretanto, de acordo com a ANOVA de 1 via, existe diferença significativa entre os grupos analisados quanto ao parâmetro frequência de nado ($F(4,45)= 5,813$; $p= 0,0007$). O teste de Bonferroni indicou que o tratamento com cafeína foi capaz de aumentar a frequência de nado quando comparado ao tratamento com salina (grupo controle). Além disso, os animais do grupo fluoxetina apresentam menor frequência de nado quando comparados aos animais do grupo cafeína. Para o parâmetro frequência de escalada, a análise estatística revelou haver diferença entre os grupos analisados por ANOVA de 1 via ($F(4,45)= 15,6$; $p<0,0001$). O teste *post hoc* de Bonferroni indicou que o tratamento com cafeína foi capaz de aumentar a frequência de escalada quando comparado aos demais tratamentos utilizados no TNF.

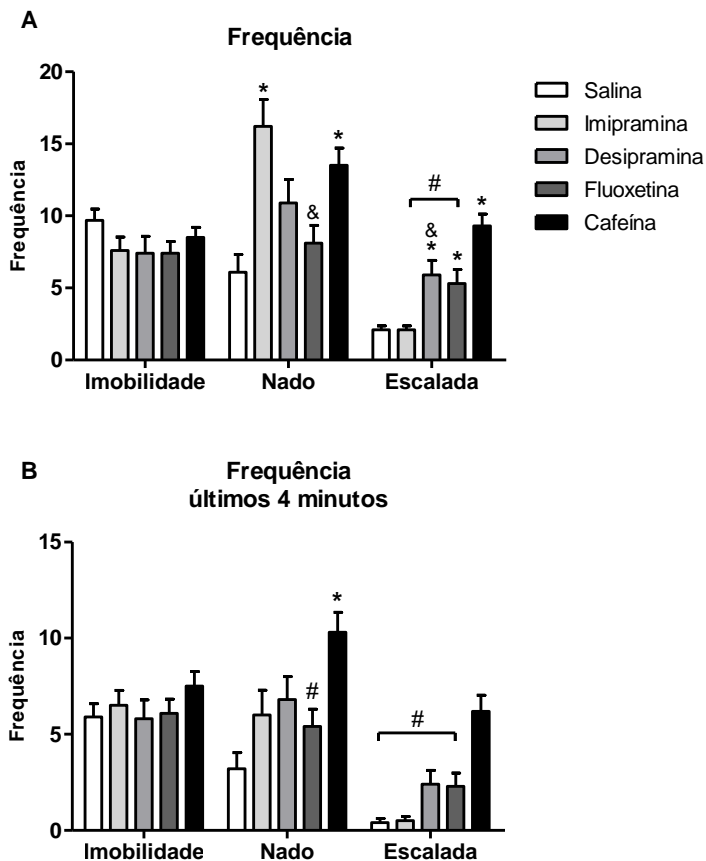


Figura 9 A) Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) na frequência total de imobilidade, nado e escalada de camundongos *Swiss* submetidos ao teste do nado forçado. B) Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) na frequência nos últimos 4 min de imobilidade, nado e escalada de camundongos *Swiss* submetidos ao teste do nado forçado. Os resultados estão representados como média + e.p.m. de 10 animais. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo cafeína e & $p < 0,05$ quando comparado ao grupo imipramina.

Os dados da análise do tempo e frequência de imobilidade feitos minuto a minuto estão representado na figura 10. No painel A (tempo de

imobilidade), a ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou que existe interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(20, 225) = 2,79$; $p = 0,0001$). A análise também revelou ser significativo o fator tratamento ($F(4,225) = 13,37$; $p < 0,0001$) e o fator tempo ($F(5,225) = 57,90$; $p < 0,0001$).

Como ilustrado nesta figura, os animais tratados com imipramina apresentam menor tempo de imobilidade do que os animais controle somente no segundo minuto do teste e, além disso, apresentam maior tempo de imobilidade quando comparados aos animais do grupo cafeína.

Já os animais tratados com desipramina apresentam menor tempo de imobilidade quando comparados aos animais controle a partir do segundo minuto do teste até o fim do mesmo. De maneira semelhante, os animais tratados com cafeína apresentam menor tempo de imobilidade do que os animais controle do início ao fim do teste. Já os animais tratados com fluoxetina apresentam menor tempo de imobilidade que os animais controle nos 3 primeiros minutos do teste, além de apresentar menor tempo de imobilidade quando comparados com os animais do grupo cafeína.

Na figura 10B estão representados os resultados da frequência de imobilidade minuto a minuto. De acordo com a ANOVA de duas vias de medidas repetidas existe interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(20, 225) = 2,16$; $p = 0,0036$), além disso, a análise também revelou ser significativo o fator tempo ($F(5,225) = 12,58$; $p < 0,0001$) entretanto o fator tratamento não foi significativo. O teste de Bonferroni revelou que os tratamentos com imipramina, desipramina, fluoxetina e cafeína foram capazes de reduzir a frequência de imobilidade quando comparados ao tratamento com salina (grupo controle).

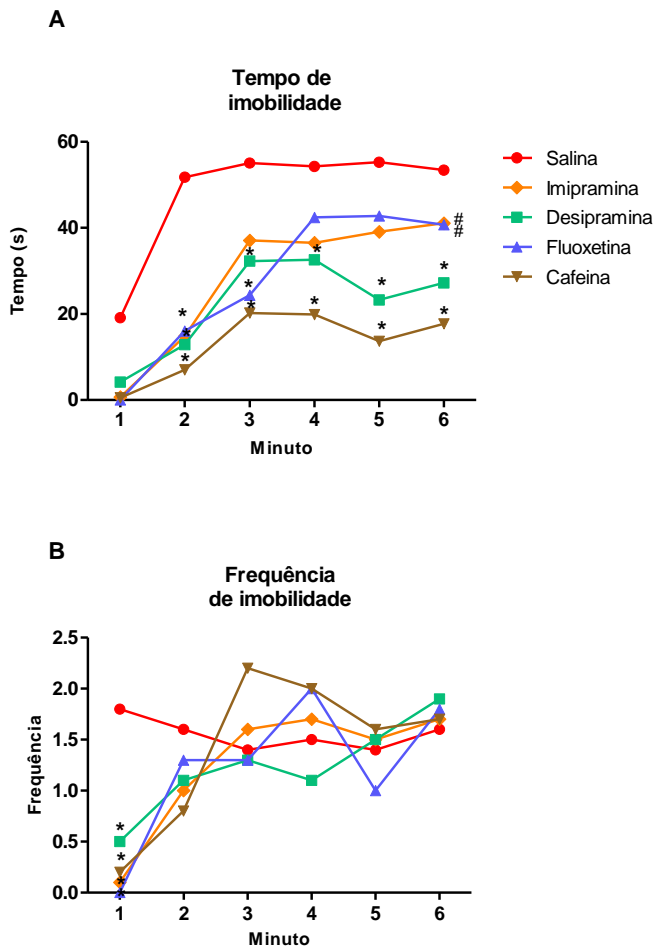


Figura 10. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo (A) e na frequência (B) de imobilidade minuto a minuto em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Os resultados estão representados como média de 10 animais, minuto a minuto. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo cafeína.

Quando o tempo e a frequência de nado são analisados minuto a minuto temos os resultados representados pela figura 11. De acordo com esta figura, no painel A temos os resultados do tempo de imobilidade

minuto a minuto. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou haver interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(20, 225) = 1,69$; $p = 0,035$), ainda revelou ser significativo o fator tratamento ($F(4,225) = 3,74$; $p = 0,0103$) e o fator tempo ($F(5,225) = 3,59$; $p = 0,0039$). O teste de Bonferroni indicou que, no segundo minuto, os animais do grupo imipramina apresentam tempo de nado maior do que aqueles que receberam salina como tratamento. Já os animais do grupo desipramina apresentam maior tempo de nado quando comparados aos animais do grupo controle nos minutos 2,4,5 e 6. Em adição, os animais do grupo fluoxetina bem como os animais do grupo cafeína apresentam maior tempo de nado quando comparados aos animais do grupo controle.

No painel B estão os resultados da análise minuto a minuto da frequência de nado dos animais submetidos ao TNF. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou haver interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(20, 225) = 2,09$; $p = 0,0053$) e também revelou ser significativo o fator tratamento ($F(4,225) = 4,55$; $p = 0,0036$) mas não o tempo. O teste *post hoc* de Bonferroni revelou que os animais que receberam cafeína como tratamento bem como os que receberam desipramina apresentaram maior frequência de nado quando comparados aos animais do grupo controle, entretanto, os animais do grupo desipramina apresentam menor frequência de nado quando comparados aos animais do grupo cafeína. Além disso, os animais dos grupos imipramina e fluoxetina também apresentam menor frequência de nado quando comparados aos animais do grupo cafeína.

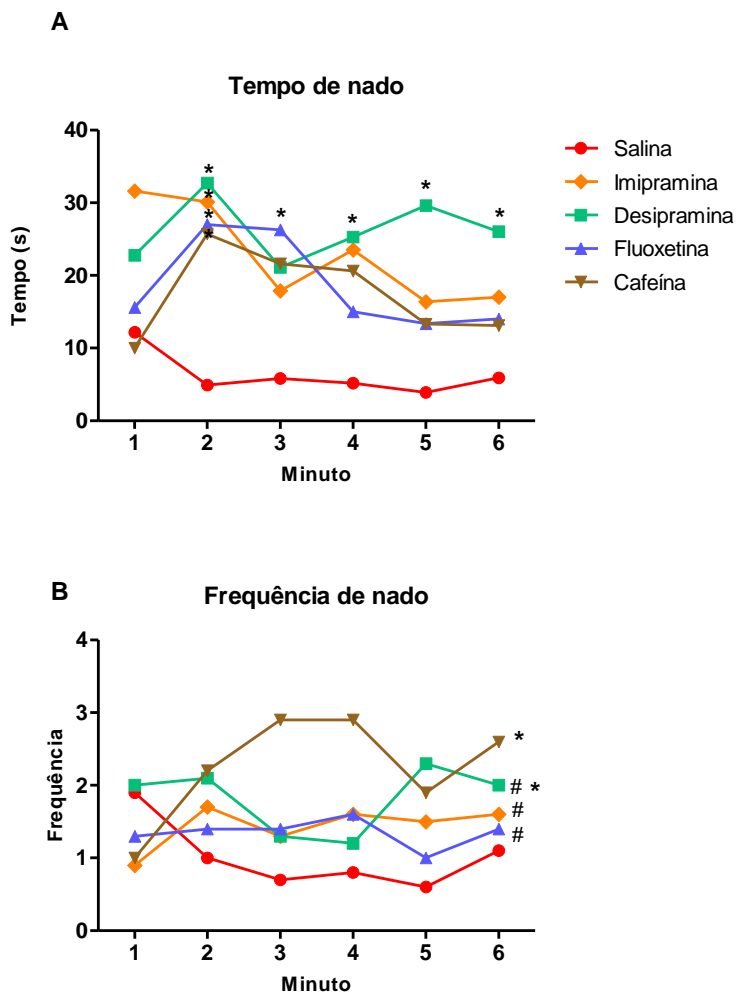


Figura 11. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo (A) e frequência (B) de nado minuto a minuto em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Os resultados estão representados como média de 10 animais, minuto a minuto. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo cafeína.

A análise minuto a minuto do tempo e frequência de escalada está representada na figura 12. Esta figura nos mostra no painel A o tempo de escalada minuto a minuto. Estes dados foram analisados via ANOVA de duas vias de medidas repetidas. A análise revelou não haver interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(20, 225) = 0,97$; $p = 0,50$), embora os fatores tratamento ($F(4,225) = 22,41$; $p < 0,0001$) e tempo ($F(5,225) = 48,94$; $p < 0,0001$) sejam significativos. Como não houve interação entre os fatores, foi feita uma ANOVA de 1 via para avaliar o fator tratamento, esta análise revelou haver diferença significativa entre os grupos ($F(4,25) = 3,323$; $p = 0,0259$) e o teste *post hoc* de Bonferroni revelou que os animais do grupo cafeína apresentam maior tempo de escalada quando comparados aos animais do grupo salina.

No painel B está representado o gráfico da análise minuto a minuto da frequência de escalada. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou haver interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(20, 225) = 1,76$; $p = 0,026$) e também revelou ser significativo o fator tratamento ($F(4,225) = 14,50$; $p < 0,0001$) bem como o fator tempo ($F(5,225) = 13,89$; $p < 0,0001$). O teste *post hoc* de Bonferroni indicou que os animais do grupo desipramina apresentam maior frequência de escalada no minuto 2 quando comparados aos animais do grupo controle. Já os animais do grupo cafeína apresentar maior frequência deste comportamento a partir do terceiro minuto até o final do teste quando comparados aos animais do grupo controle. De maneira geral, os animais do grupo cafeína também apresentam maior número de episódios de escalada do que os animais dos grupos imipramina, desipramina e fluoxetina.

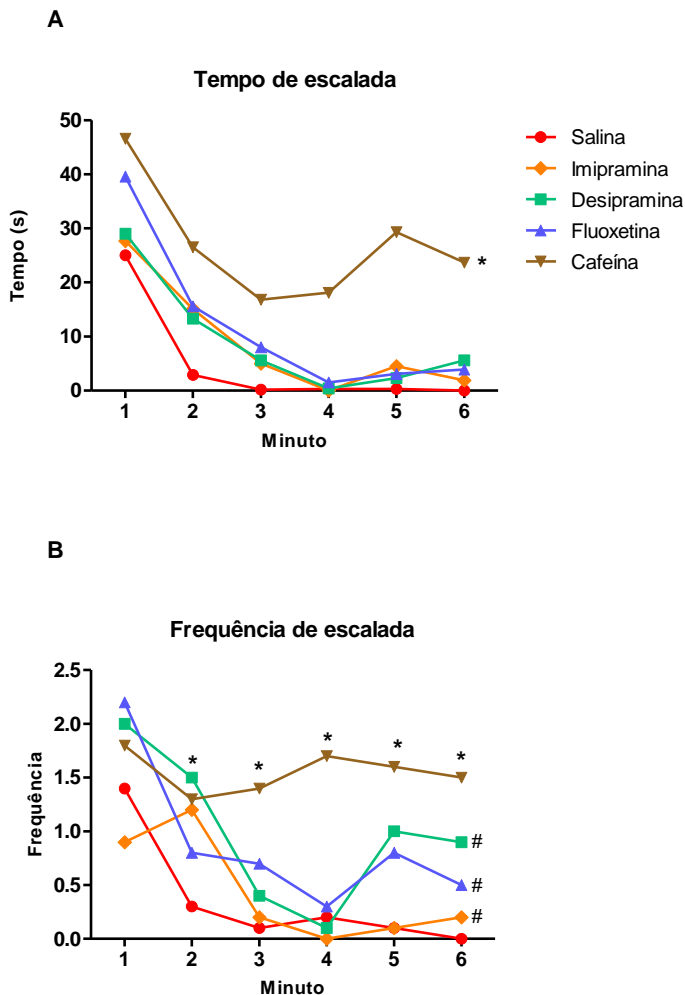


Figura 12. Efeito do tratamento com imipramina (30mg/kg, via i.p.), desipramina (30mg/kg, via i.p.), fluoxetina (30mg/kg, via i.p.) e cafeína (30mg/kg, via i.p.) no tempo (A) e frequência (B) de escalada minuto a minuto em camundongos machos submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Os resultados estão representados como média de 10 animais, minuto a minuto. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ em relação ao grupo cafeína.

6 Discussão

6.1 Discussão Geral

Nos últimos anos, o TNF e o TSC têm sido amplamente utilizados por diversos grupos de pesquisa não só para avaliar o potencial antidepressivo de fármacos como também para investigar seus mecanismos de ação (BOURIN et al., 2005). Num estudo utilizando diversas doses de imipramina (antidepressivo tricíclico), desipramina (ISRN), paroxetina (ISRS), citalopram (ISRS) e bupropiona (inibidor de receptação de dopamina) com diferentes linhagens (*Swiss*, NMRI, C57Bl/6J e DBA) submetidas ao TNF e ao TSC, Bourin e colaboradores sugeriram uma “árvore de decisão” para triagem de novos fármacos antidepressivos. Nele, os autores sugerem que o TSC utilizando a linhagem *Swiss* é suficiente para detectar o efeito do tipo antidepressivo de novos fármacos. Entretanto, para distinguir entre ISRS e antidepressivos tricíclicos, o teste do nado forçado seria o mais indicado. Apesar de muito bem conduzido e de realmente apresentar ferramentas consistentes para identificação do mecanismo de ação de fármacos antidepressivos, este trabalho é um exemplo do enorme número de grupos experimentais e animais necessários para tal avaliação.

De acordo com a literatura, nossos dados mostram que tanto fármacos antidepressivos como fármacos estimulantes do sistema nervoso central podem diminuir o tempo total de imobilidade apresentado pelos animais nos testes de TNF e TSC em camundongos. Assim, o tempo de imobilidade avaliação isoladamente não é um parâmetro fidedigno para avaliar uma possível atividade do tipo antidepressiva nestes testes. Nossos resultados confirmam estas observações. Além disso, os resultados obtidos no presente estudo mostram que, com simples mudanças metodológicas na forma de aquisição dos dados e avaliação dos mesmos, é possível não somente a discriminação de fármacos antidepressivos com diferentes mecanismos de ação entre si, mas também, é possível excluir possíveis resultados falso-positivos. Nos próximos capítulos desta discussão apresentaremos os quadros 7 e 8 com o resumo dos dados que nos permitiram tal conclusão.

6.2 O comportamento dos camundongos *Swiss* no teste de suspensão pela cauda (TSC).

De acordo com o encontrado na literatura (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005), o tratamento com fluoxetina, bem como o tratamento com cafeína, nas doses testadas, foram capazes de diminuir o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste da suspensão pela cauda. Todavia, quando analisamos a latência para a imobilidade, somente os animais tratados com cafeína apresentam maior tempo entre o início do teste e o primeiro episódio de imobilidade. Este resultado sugere que este parâmetro parece importante na diferenciação entre fármacos antidepressivos e a cafeína, pois apenas o fármaco estimulante aumenta a latência para o primeiro episódio de imobilidade. Já quando observamos a frequência de imobilidade flexionada, podemos observar que os animais do grupo desipramina apresentam maior número de episódios de imobilidade relaxada do que os animais do grupo cafeína, mostrando que este parece ser um parâmetro importante na diferenciação da cafeína de fármacos AD tipo a desipramina. Os efeitos dos tratamentos com os diferentes fármacos antidepressivos e da cafeína sobre as variáveis medidas no TSC estão resumidos no Quadro 7 apresentado a seguir.

Quadro 7. Resumo dos resultados obtidos no teste da suspensão pela cauda.

Parâmetro	Fármaco/Efeito			
	Imipramina	Desipramina	Fluoxetina	Cafeína
Latência para Imob. Relaxada	–	–	–	↑
Tempo total de Imob. Relaxada	–	–	↓	↓
Tempo total de Imob. Flexionada	–	–	–	–
Tempo total de Mov. Difusa	↑	↑	–	↑
Tempo total de Mov. Ritmada	–	–	↓	↓
Frequência Imob. Relaxada	–	↑	–	–
Frequência Imob. Flexionada	–	–	–	–
Frequência Mov. Difusa	↑	–	↓	↓
Frequência Mov. Ritmada	–	–	↓	↓
Tempo total de Imob. Relaxada *	–	–	–	↓
Tempo total de Imob. Flexionada *	–	–	–	–
Tempo total de Mov. Difusa *	↑	–	↑	↑
Tempo total de Mov. Ritmada *	–	–	–	–
Frequência Imob. Relaxada *	–	↑	–	–
Frequência Imob. Flexionada *	–	–	–	–
Frequência Mov. Difusa *	–	–	↓	↓
Frequência Mov. Ritmada *	–	–	↓	↓

As setas indicando para cima representam aumento no parâmetro ao passo que as setas indicando para baixo representam redução no parâmetro. ↑ Em relação ao grupo controle. ↑ Em relação ao grupo cafeína. ↑ Em relação ao grupo desipramina. *análise dos 4 últimos min.

Dividimos os comportamentos ativos em dois tipos: movimentação ritmada e movimentação difusa. Observamos que todos os tratamentos, exceto a fluoxetina, foram capazes de aumentar o tempo total de movimentação difusa. Entretanto, quando avaliamos o número de episódios deste comportamento, podemos observar que os animais do grupo desipramina apresentam maior frequência de movimentação difusa do que

os animais dos grupos fluoxetina e cafeína, apesar de não diferir do grupo controle.

Além disso, os animais do grupo desipramina apresentam maior tempo e frequência de movimentação ritmada quando comparados aos animais dos grupos fluoxetina e cafeína. Portanto, a qualificação e quantificação dos comportamentos ativos dos animais durante o TSC parece ser uma estratégia bastante importante na diferenciação de fármacos antidepressivos de diferentes mecanismos de ação, visto que somente os animais tratados com desipramina, um inibidor seletivo da receptação da noradrenalina, apresentaram respostas bastante diferentes dos demais grupos. Podemos ainda sugerir que o comportamento movimentação ritmada está mais intimamente relacionado com os efeitos que os ISRN exercem sobre os animais durante o teste da suspensão pela cauda, porém esta hipótese precisa ser confirmada utilizando-se outros fármacos com mecanismo de ação semelhante para podermos constatar que este é um padrão de comportamento de animais tratados com os ISRN.

De qualquer maneira, a medida do tempo e frequência de movimentação ritmada e a frequência de movimentação difusa parecem ser parâmetros comportamentais suficientes para diferenciar os fármacos ISRN dos outros antidepressivos já que a desipramina e a imipramina não afetaram estes parâmetros.

Se excluirmos da análise os primeiros dois minutos do teste da suspensão pela cauda, como sugerido por Porsolt (1977) para o teste do nado forçado (pois seria o período de maior atividade dos animais), observamos algumas mudanças nos resultados. Como podemos ver no quadro 7, a análise dos últimos 4 min mostrou que o único tratamento capaz de diminuir o tempo total de imobilidade foi a cafeína. Já no tempo de movimentação difusa, o tratamento com desipramina deixou de ser significativo em aumentar o tempo deste comportamento e o tratamento com imipramina passa a ser significativo, o que não aparecia na análise dos 6 minutos totais do teste.

O tempo de movimentação ritmada também perde os efeitos encontrados na análise dos 6 min totais quando excluímos os minutos iniciais do teste da análise. Entretanto, a frequência de movimentação ritmada continua com o mesmo perfil de resposta: os animais que receberam fluoxetina bem como os que receberam cafeína apresentam menor número de episódios de movimentação ritmada quando comparados aos animais do grupo desipramina. De uma maneira mais global, podemos sugerir que os comportamentos ativos mostram-se mais importantes na diferenciação de fármacos antidepressivos com distintos mecanismos de ação do que o comportamento de imobilidade, visto que foram os comportamentos ativos os únicos capazes de diferenciar a ação da desipramina, um ISRN, dos demais fármacos AD e do estimulante

utilizados. Este resultado encontra embasamento no estudo feito por Berrecoso e colaboradores em 2012, o qual mostra que a diferenciação dos comportamentos ativos, que embora não sejam os mesmos que propusemos no presente trabalho, podem distinguir os efeitos de fármacos opióides dos efeitos de fármacos antidepressivos no teste da suspensão pela cauda.

A análise minuto a minuto mostra-se importante para que possa ser observado como o animal se comporta ao longo do teste e como os tratamentos podem influenciar nessa escala temporal de comportamentos, assim como observado por Lino-de-Oliveira e colaboradores (2005) ao analisar a estrutura comportamental de ratos no teste do nado forçado. Sendo assim, o teste da suspensão pela cauda foi analisando também minuto a minuto. Tal importância é evidenciada quando observamos os resultados obtidos no experimento 1 o qual utilizou 30 animais sem tratamento. No quadro 2 podemos observar que no decorrer do TSC o tempo despendido em cada comportamento muda: os animais apresentam maior movimentação nos minutos iniciais do teste e de maneira complementar apresentam menor imobilidade nos minutos iniciais.

Quando analisamos os animais do experimento 2, com os diferentes tratamentos, podemos observar que os animais que receberam cafeína como tratamento foram os únicos a apresentar um menor tempo de imobilidade desde o segundo minuto do teste até o final do mesmo. Além disso, este tratamento também foi o único a reduzir a frequência deste comportamento nos minutos 2, 3 e 5. Sendo assim, a análise minuto a minuto dá suporte aos resultados obtidos quando analisamos o tempo total sem discriminar cada minuto.

Já para o comportamento movimentação difusa, a análise minuto a minuto revela que o tempo total de movimentação difusa é maior nos animais que receberam cafeína como tratamento a partir do segundo minuto do teste até o final do mesmo. De maneira interessante, os animais que receberam fluoxetina também apresentam maior tempo de movimentação difusa do que os animais controle nos minutos 2, 3, 4, e 5, podendo esta análise ser valiosa para a diferenciação de ISRS de outros fármacos antidepressivos. Além disso, o grupo de animais tratados com cafeína apresenta, de maneira geral, maior tempo deste comportamento do que os animais dos grupos imipramina, desipramina e fluoxetina. Portanto, este parâmetro também serve para diferenciar o perfil de fármacos estimulantes tipo a cafeína dos AD utilizados neste trabalho.

Já quando a frequência de movimentação difusa é analisada minuto a minuto, somente os animais que receberam desipramina apresentam maior frequência deste comportamento quando comparados aos animais do grupo controle. Os outros tratamentos nada diferem do grupo controle nesta análise. Desta forma, podemos concluir que a análise minuto a minuto do comportamento movimentação difusa pode evidenciar os efeitos da

desipramina na frequência deste comportamento e os efeitos da fluoxetina e da cafeína no tempo deste comportamento. Além disso, é possível distinguir a fluoxetina da cafeína usando o tempo de movimentação difusa minuto a minuto, embora ambos sejam diferentes do grupo controle, o grupo cafeína também é diferente do grupo fluoxetina. De maneira complementar, podemos utilizar ainda os outros parâmetros adicionais que nos possibilitam diferenciá-los, como, por exemplo, a latência para a imobilidade que é maior apenas nos animais tratados com cafeína.

O comportamento de movimentação ritmada, quando analisado minuto a minuto, evidencia a diferença existente entre os animais tratados com desipramina e os animais tratados com fluoxetina, imipramina e cafeína, visto que comparado a estes grupos, a desipramina foi capaz de aumentar a frequência deste comportamento.

Um importante dado que a análise minuto a minuto nos fornece sobre a movimentação dos animais durante o teste é que de fato, os animais controle apresentam maior movimentação nos minutos iniciais do teste, evidenciado pela curva crescente do parâmetro imobilidade nestes animais e decrescente no parâmetro movimentação difusa, de acordo com o apresentado pelos 30 animais analisados sem qualquer tratamento.

Resumindo, com os diversos tipos de análise do teste da suspensão pela cauda podemos inferir que é possível diferenciar fármacos estimulantes, tipo a cafeína, de fármacos antidepressivos – excluindo os possíveis falso-positivos de uma triagem de antidepressivos – se observarmos a latência para a imobilidade, a frequência de imobilidade, a frequência de movimentação difusa, tempo e frequência de imobilidade minuto a minuto e o tempo de movimentação difusa minuto a minuto. Além disso, conseguimos diferenciar a desipramina (ISRN) de outros fármacos antidepressivos observando os parâmetros: tempo e frequência de movimentação ritmada, frequência de movimentação difusa, frequência de movimentação difusa minuto a minuto, frequência de movimentação ritmada minuto a minuto. No entanto, para podermos generalizar tais fatos o ideal seria fazer este tipo diferenciado de análise com vários fármacos de mesma classe para confirmar se este é um padrão de comportamento influenciado pelo tratamento com fármacos específicos, como os aqui testados, ou pela classe de fármacos a que pertencem estes compostos; além de ser necessário comparar o tratamento agudo com antidepressivos como o crônico (repetido) para melhor caracterizar estas diferenças entre os diversos fármacos.

Se reunirmos os resultados obtidos da submissão de animais tratados ao TSC com os resultados obtidos na análise de componentes principais, podemos sugerir algumas interpretações quanto aos componentes gerados pela ACP. O primeiro componente, composto pelo tempo e a frequência de imobilidade relaxada e tempo e frequência de imobilidade

flexionada, nos permite sugerir que os parâmetros tempo e frequência de imobilidade flexionada podem ser substituídos pela medida somente de tempo e frequência de imobilidade relaxada, já que estas medidas parecem ser complementares. Além disso, quando observamos os animais dos diferentes grupos de tratamento podemos perceber que o comportamento imobilidade flexionada não é muito frequente e então resolvemos excluí-lo da análise minuto a minuto.

O segundo fator gerado pela ACP é composto pelos parâmetros tempo e frequência de movimentação ritmada, o que sugere que não seria necessário fazer a medida de ambos os parâmetros, bastando apenas fazer a medida de um ou de outro. Este resultado encontra maior importância quando o cruzamos com os resultados obtidos com os animais tratados com os diferentes antidepressivos. O tratamento com desipramina foi o único capaz de alterar este comportamento e ele altera tanto o tempo quanto a frequência do mesmo. Com estas evidências, podemos sugerir que este segundo componente esteja relacionado com os efeitos da desipramina nos animais submetidos ao teste da suspensão pela cauda, podendo estar diretamente correlacionado à sua ação no sistema noradrenérgico.

O terceiro componente acomoda somente o tempo de movimentação difusa e, portanto, as medidas deste parâmetro não podem ser substituídas pela medida de outras variáveis no TSC. Já o quarto fator, composto pelos parâmetros frequência de imobilidade relaxada e frequência de movimentação difusa quando cruzado com os resultados dos animais tratados com os diferentes não permite maiores conclusões sobre sua utilidade prática.

O trabalho publicado por Berrocoso e colaboradores (2012), o qual detectou que os comportamentos ativos apresentados por camundongos submetidos ao teste da suspensão pela cauda são diferentemente modulados por fármacos opióides e fármacos antidepressivos, apresenta pela primeira vez a análise dos comportamentos ativos, entretanto não mostra qual é a distribuição temporal destes comportamentos e utiliza linhagens construídas através de cruzamentos de linhagens de camundongos altamente específicas, tornando mais difícil a difusão deste tipo de análise. Diferentemente, nosso trabalho mostra a distribuição temporal dos comportamentos ativos e utiliza a linhagem *Swiss* que é amplamente utilizada em triagens de fármacos.

6.3. O comportamento dos camundongos *Swiss* no teste de nado forçado.

No teste do nado forçado, os tratamentos com imipramina, desipramina, fluoxetina e cafeína foram capazes de aumentar a latência para o primeiro episódio de imobilidade. Estes tratamentos também foram

capazes de diminuir o tempo total de imobilidade. Portanto, se analisarmos somente estes parâmetros, relacionados aos comportamentos passivos (imobilidade) não seria possível a discriminação entre fármacos antidepressivos e fármacos estimulantes tipo a cafeína nem a discriminação de fármacos AD com diferentes mecanismos de ação. Os efeitos dos tratamentos com os diferentes fármacos antidepressivos e da cafeína sobre as variáveis medidas no TNF estão resumidos no Quadro 8 a seguir.

Quadro 8. Resumo dos resultados obtidos no teste do nado forçado.

Parâmetro	Fármaco/Efeito			
	Imipramina	Desipramina	Fluoxetina	Cafeína
Tempo total de Imobilidade	↓ ↑	↓	↓	↓
Tempo total de Nado	↑	↑	–	–
Tempo total de Escalada	↓	↓	↓	↑
Frequência Imobilidade	–	–	–	–
Frequência Nado	↑	–	↓	↑
Frequência Escalada	↓	↑ ↓	↑ ↑ ↓	↑
Tempo total de Imobilidade *	↑	↓	↑	↓
Tempo total de Nado *	–	↑	–	–
Tempo total de Escalada *	↓	↓	↓	↑
Frequência Imobilidade *	–	–	–	–
Frequência Nado *	–	–	↓	↑
Frequência Escalada *	↓	↓	↓	↑

As setas indicando para cima representam aumento no parâmetro ao passo que as setas indicando para baixo representam redução no parâmetro. ↑ Em relação ao grupo controle. ↓ Em relação ao grupo cafeína. ↑ Em relação ao grupo imipramina. *análise dos 4 últimos min.

Ao analisarmos os comportamentos ativos, algumas diferenças começam a aparecer. Por exemplo, somente os animais dos grupos imipramina e do grupo desipramina apresentaram maior tempo de nado quando comparados aos animais do grupo controle, o que não acontece com os animais do grupo fluoxetina e esta pode ser uma diferenciação entre os efeitos da fluoxetina e os efeitos dos outros antidepressivos utilizados neste trabalho. Além disso, os animais que receberam cafeína exibiram maior tempo de escalada quando comparados aos animais do grupo controle e os animais dos demais grupos quando comparados aos animais tratados com cafeína apresentam menor tempo de escalada, mostrando que este parâmetro parece ser importante na discriminação de fármacos estimulantes tipo a cafeína de fármacos AD.

Podemos sugerir que a análise diferenciada destes parâmetros em camundongos são tão importantes, quanto a análise feita em ratos no trabalho publicado por Detke e colaboradores (1995) no qual fármacos ISRS e fármacos ISRN podem ser diferenciados por modularem de maneira diferente os comportamentos ativos dos animais no teste (os ISRN aumentam a escalada enquanto os ISRS aumentam o nado).

Quando incluímos na análise o número de vezes que cada comportamento aparece durante o tempo total do teste (frequência) temos que os animais dos grupos imipramina e cafeína apresentam maior frequência de nado durante o teste quando comparados aos animais do grupo salina. Além disso, os animais do grupo fluoxetina apresentam menor frequência de nado em relação aos animais do grupo imipramina, e essa parece ser uma diferença bastante importante para diferenciação da ação destes dois fármacos antidepressivos. Em adição, a frequência de escalada é maior nos animais dos grupos desipramina, fluoxetina e cafeína em comparação aos animais do grupo controle. Contudo, quando a comparação é feita com os animais que receberam cafeína como tratamento, os animais dos grupos fluoxetina, imipramina e desipramina apresentam menor frequência de escalada. Sendo assim, estes resultados são bastante semelhantes aos encontrados em ratos, onde a frequência de escalada é um parâmetro que pode excluir possíveis efeitos motores de fármacos estimulantes (LINO-DE-OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2005; VIEIRA, 2008).

Ao excluirmos da análise os dois primeiros minutos do teste, obtivemos um perfil de resposta um pouco diferente à análise do bloco de 6 minutos. Por exemplo, enquanto a análise do tempo total, sem a exclusão dos minutos iniciais, aponta que todos os tratamentos são capazes de reduzir o tempo de imobilidade, na análise dos últimos 4 minutos somente os animais tratados com desipramina e cafeína promovem a redução deste parâmetro quando comparados aos animais do grupo controle. Além disso, os animais dos grupos imipramina e fluoxetina apresentam maior tempo

total de imobilidade quando comparados aos animais do grupo cafeína. No caso do presente estudo, para camundongos, a exclusão dos primeiros 2 minutos do teste parece ser arriscada, pois aparecem alguns resultados “falso-negativos”, já que nem a imipramina, nem a fluoxetina, foram capazes de diminuir o tempo de imobilidade e aumentar o tempo de nado. Além disso, a redução do tempo de análise não auxilia a diferenciar os antidepressivos com mecanismos de ação distintos, embora seja ainda capaz de diferenciar a cafeína dos mesmos, pois na análise da frequência de escalada nos últimos 4 minutos, a diferença de resposta da cafeína em relação aos demais grupos é mantida.

A frequência de nado nos últimos 4 minutos é maior apenas nos animais que receberam desipramina como tratamento, entretanto, os outros tratamentos também parecem afetar este comportamento, embora não de maneira significativa. Por conseguinte, este último parâmetro também não é capaz de diferenciar os distintos fármacos utilizados neste estudo quando a análise é feita apenas dos 4 minutos finais do teste.

Já a análise minuto a minuto revela que tanto o tratamento com desipramina, quanto o tratamento com cafeína, são os únicos capazes de diminuir o tempo total de imobilidade a partir do 1º minuto de teste, ou seja, nos minutos 2, 3, 4, 5 e 6 do teste do nado forçado. Além disso, a análise revela que o tempo de imobilidade nos animais do grupo controle apresenta uma curva crescente que se estabiliza já no segundo minuto do teste, resultado este semelhante ao de ratos na análise minuto a minuto feita por Lino-de-Oliveira e colaboradores (2005), onde os animais apresentam menor tempo de imobilidade já nos minutos iniciais do teste. O parâmetro frequência de imobilidade, por sua vez, parece não ser importante na diferenciação entre os diferentes tratamentos em camundongos. Desta maneira, estes parâmetros também não são capazes de diferenciar os fármacos distintos utilizados na avaliação.

Todavia, o parâmetro tempo de nado minuto a minuto revela que o tratamento com imipramina, com fluoxetina, com desipramina e com cafeína são capazes de aumentar o tempo de nado no segundo minuto do teste, quando comparados com o grupo controle, embora somente o grupo desipramina tenha apresentado este efeito também nos minutos finais do teste (4º, 5º e 6º). Desta forma, a análise minuto a minuto do tempo de nado revelou que somente os animais que receberam desipramina apresentam maior tempo de nado nos minutos 2, 4, 5 e 6, podendo este comportamento estar mais relacionado com o sistema noradrenérgico, visto que este fármaco inibe preferencialmente a recaptção de noradrenalina. Tais achados devem ser checados com a utilização de antagonistas do sistema noradrenérgico para confirmar se este resultado está realmente relacionado aos seus efeitos neste sistema.

De maneira bastante evidente, o tratamento com cafeína é o único capaz de aumentar o tempo de escalada em todos os minutos do teste, ou seja, os animais que receberam cafeína como tratamento apresentam um tempo escalada maior comparado aos animais controle. Este parece ser um parâmetro bastante confiável na exclusão de um resultado falso positivo. Aliado a ele, temos os resultados da frequência de escalada minuto a minuto, onde o tratamento com cafeína foi o único capaz de aumentar o número de episódios de escalada a partir do terceiro minuto do teste e os demais tratamentos apresentam menor frequência de escalada quando comparados aos animais do grupo cafeína. Estes resultados, em conjunto, são suficientes para diferenciar a cafeína dos demais fármacos utilizados neste trabalho.

A análise minuto a minuto reforça os resultados que já apareceram na análise do tempo total, onde o tratamento com cafeína foi o único capaz de aumentar a frequência e o tempo de escalada em camundongos submetidos ao TNF. Este resultado vai ao encontro dos resultados obtidos com ratos, onde essa diferenciação pode ser feita analisando a frequência de escalada, sem a necessidade da análise minuto a minuto, onde os animais que receberam cafeína como tratamento mostraram um maior número de cruzamentos no campo aberto e uma maior frequência de escalada no teste do nado forçado (VIEIRA et al, 2008).

A análise de componentes principais gerou 3 fatores que, juntamente com os dados obtidos dos experimentos em que os animais foram tratados com imipramina, desipramina, fluoxetina e cafeína, nos permitiram algumas interpretações importantes: podemos perceber que o componente III parece estar relacionado com o sistema motor, visto que tanto a frequência de escalada quando a duração deste comportamento é maior nos animais que receberam cafeína em todas as formas de análise. Da mesma forma, o componente I, que envolve os parâmetros latência para a imobilidade, duração de nado e duração de imobilidade, parece refletir um componente que mostra a capacidade do TNF em avaliar uma atividade antidepressiva, visto que estes parâmetros são os mais modificados pelo tratamento com os diferentes antidepressivos. Além disso, esta análise permite sugerir que apenas um destes parâmetros, a duração de nado por exemplo, seja avaliado com a finalidade de facilitar a aquisição dos dados no dia a dia laboratorial. Já o componente II aparentemente nada esclarece em relação aos parâmetros relacionados a ele (frequência de imobilidade e frequência de nado) que possa auxiliar na avaliação e distinção de fármacos antidepressivos.

Se avaliarmos em conjunto os testes utilizados neste trabalho e os diferentes efeitos que os fármacos neles utilizados apresentaram, é possível propor qual teste é o mais apropriado para cada classe de fármaco. Embora este trabalho tenha utilizado somente camundongos de uma única linhagem,

o uso da linhagem *Swiss* mostra-se uma estratégia bastante robusta para a pesquisa de novos fármacos antidepressivos, como já proposto por Bourin e colaboradores (2005). Portanto, utilizando-se a linhagem *Swiss*, pode-se sugerir que quando o fármaco avaliado é um antidepressivo tricíclico, como a imipramina, o teste mais apropriado para sua investigação é o teste do nado forçado, visto que as respostas dos animais submetidos a este tratamento frente a este teste foram mais robustas do que as apresentadas pelos animais submetidos ao teste da suspensão pela cauda. O mesmo acontece com a fluoxetina, um ISRS, onde os resultados obtidos no teste do nado forçado foram mais robustos, o que vai de encontro ao encontrado por Szymczyk e Zebrowska-Lupina (2000), os quais não encontraram efeito deste fármaco no TNF em camundongos. Já para a desipramina, um ISRN, o melhor teste parece ser o teste da suspensão pela cauda, visto que os animais que receberam este fármaco como tratamento apresentaram um comportamento bastante distinto neste teste: a movimentação ritmada. Para descartar falso-positivos, como, por exemplo, estimulantes de ação no sistema adenosinérgico, tanto o TNF quanto o TSC parecem ser bastante adequados, pois a cafeína apresentou um padrão de comportamento bastante distinto dos antidepressivos em cada teste (maior tempo e frequência de escalada no TNF e maior latência para imobilidade e maior tempo de movimentação difusa no TSC).

É claro que não podemos ignorar o fato de que para ambos os testes a dose dos fármacos utilizada foi a mesma e isso pode ter influenciado na diferença dos resultados, visto que a maioria dos antidepressivos reduz a duração da imobilidade no TSC em doses menores que as necessárias para o mesmo efeito no TNF (LIU E GERSHENFELD, 2001)

Além disso, no estudo realizado por Yoshikawa e colaboradores (2002) os resultados mostraram que os genes envolvidos com o comportamento de imobilidade no TNF e no TSC estão presentes majoritariamente nos cromossomos 8 e 11 de camundongos da segunda geração proveniente do cruzamento entre as linhagens C57BL/6 e C3H/He. Em combinação com a similaridade da construção destes dois paradigmas, a variância combinada para os QTLs (*quantitative trait loci*) presentes nestes cromossomos foi de 47% para o TNF e de 48% para o TST (YOSHIKAWA et al., 2002). Isto significa que, provavelmente, o comportamento de imobilidade possui significados bastante semelhantes para o TNF e para o TSC, mas nada se sabe quanto aos comportamentos ativos de ambos os testes, e é exatamente nestes comportamentos ativos que observamos, no presente trabalho, as maiores diferenças de perfil entre os diferentes fármacos utilizados neste trabalho, que permite sua distinção em termos de atividade e mesmo de mecanismo de ação.

7 Conclusão

- Com este trabalho verificamos que a análise tradicional dos testes da suspensão pela cauda e do teste do nado forçado parece ser um tanto quanto superficial e abre espaço para avaliações errôneas de fármacos dos quais se desconhece o mecanismo de ação. Ou seja, a medida tradicional da duração de imobilidade em ambos os testes permite que fármacos que não possuam potencial antidepressivo tipo fármacos estimulantes, como a cafeína sejam interpretados com antidepressivos, bem como permite que fármacos que possuem este potencial não sejam considerados como tal, quando se analisa apenas os 4 minutos finais. Com a adição da observação e mensuração dos comportamentos ativos exibidos pelos animais durante ambos os testes é possível extrair informações mais consistentes que permitam não só a identificação de fármacos antidepressivos, como também ajudam na exclusão de resultados falso-positivos e mesmo a distinção de fármacos antidepressivos com diferentes mecanismos de ação.

- Se a intenção for a identificação de fármacos antidepressivos com mecanismo de ação do tipo da desipramina, um inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina, e sua discriminação de outros fármacos antidepressivos, o teste da suspensão pela cauda parece ser mais indicado, visto que este foi o único fármaco capaz de aumentar o tempo e a frequência do comportamento movimentação ritmada.

- Se o objetivo for excluir os possíveis falso-positivos, ambos os testes parecem ser seguros para diferenciar os efeitos de estimulantes, como a cafeína, dos efeitos de fármacos antidepressivos, pois a cafeína aumenta o tempo e a frequência de escalada no TNF e aumenta a latência para imobilidade e o tempo de movimentação difusa no TSC. Além disso, o teste do nado forçado parece ser capaz também de diferenciar os efeitos da imipramina, um antidepressivo tricíclico, de outros fármacos antidepressivos, visto que este é o único dos antidepressivos utilizados neste trabalho que promoveu maior frequência de nado e não afetando a frequência de escalada.

- O presente trabalho permite concluir que estes testes podem, e devem, passar por atualizações metodológicas que proporcionem uma melhor avaliação de diferentes fármacos de ação no sistema nervoso central, diminuindo o número de grupos experimentais e, conseqüentemente, o número de animais utilizados em baterias de testes de investigação de potenciais antidepressivos ou outros psicofármacos.

- Mudanças metodológicas como a modificação tanto da maneira de se observar um animal frente a um teste, quanto da aquisição dos comportamentos e da avaliação estatística dos mesmos, pode nos revelar muito mais do que normalmente estes testes revelam da maneira como são habitualmente feitos.

8 Referências

ANDREATINI, R. A importância dos modelos animais em psiquiatria. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 24, n. 4, p. 164, 2002.

BAI, F. et al. Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v.70, n.2-3, p.187-92, 2001.

BERNARDI, M.; GENEDANI, S.; TAGLIAVINI, S.; BERTOLINI, A, Effect of castration and testosterone in experimental models of depression in mice. **Behav Neurosci**, v.103, p. 1148–1150, 1989.

BERROCOSO, E. et al. Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, (2012), doi:10.1017/S1461145711001842

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**, v.7, n.2, p.137-51, 2006.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology** (Berl), v.94, n.2, p.147-60, 1988.

BORSINI, F. et al. Seasonal and circadian variations of behavioural response to antidepressants in the forced swimming test in rats. **Behavioural Pharmacology**, v.1, n.5, p.395-401, 1990.

BOURIN, M. et al. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behavioural Brain Research**, v.164, n.2, p.266-9, 2005.

BRUNELLO, N. et al. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. **European Neuropsychopharmacology**, v.12, n. 5, p.461-475, 2002.

COBEA. **Manual para técnicos em bioterismo**. São Paulo: Winner, 1996. 3 v.

CRAWLEY, J.N. What's Wrong with My Mouse? **Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice**. New York: Wiley-Liss, John Wiley & Sons, Inc., 2000.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry*, v.9, n.4, p.326-57, 2004.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.23, n.5, p.238-45, 2002.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.29, n.4-5, p.571-625, 2005.

DALVI, A.; LUCKI, I. Murine models of depression. *Psychopharmacology* (Berl), v.147, n.1, p.14-6, 1999.

DAL-ZOTTO, S.; MARTI, O.; ARMARIO, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behavioural Brain Research*, v.114, n.1-2, p.175-81, 2000.

DAVID, D. J. et al. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology* (Berl), v.166, n.4, p.373-82, 2003.

DETKE, M. J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, v.5, n.2, p.107-12, 1997.

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, v.121, n.1, p.66-72, 1995.

DEUSSING, J. M. Animal Models of Depression. *Drug Discovery Today: Disease Models*, v.3, n.4, p.375-83, 2006.

DIXON, K. Ethological strategies for defence in animals and humans: their role in some psychiatric disorders," *British Journal of Medical Psychology*, vol. 71, n. 4, p. 417-445, 1998.

DUBROVSKY, B. Evolutionary psychiatry. Adaptationist and nonadaptationist conceptualizations. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.26, n.1, p.1-19, 2002.

ESPEJO, E. F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. **Behavioural Brain Research**, v.87, n.2, p.233-8, 1997.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.1, p.59-65, 2004.

FEIJÓ, A. G. S.; BRAGA, L. M. G. M.; PITREZ, P. M. C.(Org). **Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2010. p.43-55.

GILBERT, P.; ALLAN, S. The role of defeat and entrapment (arrested flight) in depression: an exploration of an evolutionary view. **Psychological Medicine**, v.28, n.3, p.585-98, 1998.

GUARDIOLA-LEMAÎTRE, B. ; LENÈGRE, A.; PORSOLT, R.D. Combined effects of diazepam and melatonin in two tests for anxiolytic activity in the mouse. **Pharmacol Biochem Behav**, v.41, n.2, p.405-408, 1992.

GUIMARÃES, F. S. Modelos experimentais de doenças mentais. **Revista ABP-APAL**, v.15, n.4, p.149-52, 1993.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, 385– 403, 1934.

HASLER, G. et al.. Discovering endophenotypes for major depression. **Neuropsychopharmacology**, v.29, n.10, p.1765-81, 2004.

HOLMES, A. et al. Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. **Neuropsychopharmacology**, v.27, n.6, p.914-23, 2002.

IVY, A. C. The history and ethics of the use of human subjects in medical experiments. **Science**, v.108, 1-5, 1948.

JONES, I.; BLACKSHAW, J. K. An evolutionary approach to psychiatry. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, v.34, n.1, p.8-13, 2000.

KELLY, J. P.; LEONARD, B. E. The effect of tianeptine and sertraline in three animal models of depression. *Neuropharmacology*, v.33, n.8, p.1011-6, 1994.

KITADA, Y. et al. Effects of antidepressants in the rat forced swimming test. *The European Journal of Pharmacology*, v.72, n.2-3 p.145-52, 1981.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Animal Models of Depression: Molecular Perspective. **Molecular and Functional Models in Neuropsychiatry, Current Topics in Behavioral Neuroscience**, v.7, p.121-147, 2011.

LINO-DE-OLIVEIRA C.; DE LIMA, T. C.; DE PADUA CAROBREZ, A. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. *Behavioural Brain Research*, v.158, n.2, p.243-50, 2005.

LIU, X.; GERSHENFELD, H.K. Genetic differences in the tail-suspension test and its relationship to imipramine response among 11 inbred strains of mice. *Biol.Psychiatry*, v.49, p.575-581, 2001.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behavioural Pharmacology*, v.8, n.6-7, p.523-32, 1997.

LUCKI, I.; DALVI, A.; MAYORGA, A. J. Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v.155, n.3, p.315-22, 2001.

MAUBACH, K. A. et al. Novel strategies for pharmacotherapy of depression. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.3, n.4, p. 481-488, 1999.

MCKINNEY, W. T.Jr.; BUNNEY, W. E. Jr. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Archives of General Psychiatry*, v.21, n.2, p.240-8, 1969.

MCLOUGHLIN, G. Is depression normal in human beings? A critique of the evolutionary perspective. *International Journal of Mental Health Nursing*, v.11, n.3, p.170-3, 2002.

NARDI, A. E. Depressão no cliço da vida. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.22, p.149-152, 2000.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nature Neuroscience**, v.5, p.1068-1070, 2002.

NESSE, R. M. Is depression an adaptation? **Archives of General Psychiatry**, v.57, n.1, p.14-20, 2000.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v.34, n.1, p.13-25, 2002.

NICOLL, C. S.; RUSSELL, S. M. Mozart, Alexander the Great, and the animal rights/liberation philosophy. **Faseb J**, v.5, n.14, p.2888-92, 1991.

O'NEILL, M.F.; FERNANDEZ, A.G.; PALACIOS, J.M. GR 127935 blocks the locomotor and antidepressant-like effects of RU 24969 and the action of antidepressants in the mouse tail suspension test. **Pharmacol Biochem Behav**, v.53, p.535-539, 1996.

PAGE, M. E. et al. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology (Berl)**, v.147, n.2, p.162-7, 1999.

PAPAKOSTAS, G. Psychosocial functioning during the treatment of major depressive disorder with fluoxetine. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v.24, n.5, p.507-511, 2004.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology (Berl)**, v.177, n.3, p.245-55, 2005.

PORSOLT, R. D. Animal models of depression: utility for transgenic research. **Reviews in the Neurosciences**, v.11, n.1, p.53-8, 2000.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v.229, n.2, p.327-36, 1977.

_____. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. **The European Journal of Pharmacology**, v.51, n.3, p.291-4, 1978.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v.266, p.730-2, 1977.

PRESTON WEST, A. Neurobehavioral studies of forced swimming: The role of learning and memory in the forced swim test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.14, n.6, p.63-877, 1990.

RAYMUNDO, M. M.; GOLDIM, J. R. Ética da pesquisa em modelos animais. **Bioética**, v.10, n.1, p.31-44, 2002.

REICH, W. T. **Encyclopedia of bioethics**. 2. ed. Nova Iorque: Macmillan, 1995. p. 143-144.

RENARD, C. E. et al. Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.17, n.4, p.449-55, 2003.

RODGERS, J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.289-304, 1997.

RODRIGUES, A.L. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci.**, v.70, n.12, p.1347-58, 2002.

RUPNIAK N.M. Animal models of depression: challenges from a drug development perspective. **Behavioural Pharmacology**, v.14, v.5-6, p.385-90, 2003.

SIMON, G. E. et al. Outcomes of "inadequate" antidepressant treatment. **Journal of General Internal Medicine**, v.10, n.12, p.663-670, 1995.

SOLOMON M.B. et al. Deletion of forebrain glucocorticoid receptors impairs neuroendocrine stress responses and induces depression-like behavior in males but not females. **Neuroscience**, v. 203, p. 135-143, 2011.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.85, n.3, p.367-70, 1985.

_____. The automated tail suspension test: a computerized device which differentiates psychotropic drugs. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.11, p. 659–671, 1987.

SZYMCZYK, G.; ZEBROWSKA-LUPINA I. Influence of antiepileptics on efficacy of antidepressant drugs in forced swimming test. **Polish Journal of Pharmacology**, v.52, n.5, p.337-44, 2000.

THIERRY, B. et al. Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? **Behavioral and Neural Biology**, v.41, n.2, p.180-9, 1984.

THIERRY, B.; STÉRU, L.; SIMON, P.; POROLT, R.D. The tail suspension test: ethical considerations. **Psychopharmacology**, v.90, n.2, p.284-85, 1986.

VIEIRA, C. et al. Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. **Neuroscience Letters**, v.445, n.2, p.170-3, 2008.

WILLNER, P. Cognitive functioning in depression: a review of theory and research. **Psychological Medicine**, v.14, n.4, p.807-23, 1984.

WEISS; KILTS C. Animal models of depression and schizophrenia In: SCHATZBERG, NEMEROFF, (org) **Textbook of psychopharmacology**. Washington (DC): American Psychiatric Press Inc., 1998. p. 89-131.

YOSHIKAWA et al. Identification of Multiple Genetic Loci Linked to the Propensity for “Behavioral Despair” in Mice. **Genome Research**, v.12, n. 3, p. 357-366, 2002.